



Title	Compositions and methods for preventing and treating liver cirrhosis
Inventor(s)	Xu, Ruian; Li, Xinyan; Fung, Peter
Citation	China Published Patent Application CN 1829797. Beijing, PRC: State Intellectual Property Office (SIPO) of the P.R.C., 2006
Issued Date	2006
URL	http://hdl.handle.net/10722/176687
Rights	Creative Commons: Attribution 3.0 Hong Kong License For Public Patent Documents

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480021790.6

[51] Int. Cl.

C12N 15/51 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

C12N 15/66 (2006.01)

A61K 35/76 (2006.01)

[43] 公开日 2006 年 9 月 6 日

[11] 公开号 CN 1829797A

[22] 申请日 2004.5.28

[21] 申请号 200480021790.6

[30] 优先权

[32] 2003.5.28 [33] US [31] 60/473,992

[86] 国际申请 PCT/CN2004/000553 2004.5.28

[87] 国际公布 WO2004/106523 英 2004.12.9

[85] 进入国家阶段日期 2006.1.26

[71] 申请人 香港大学

地址 中国香港薄扶林道

[72] 发明人 许瑞安 李欣燕 冯戡云

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 张轶东 王景朝

权利要求书 3 页 说明书 54 页 附图 23 页

[54] 发明名称

用于预防和治疗肝硬化的组合物和方法

[57] 摘要

本发明提供了治疗受试者中的肝硬化的方法，包括给受试者施用治疗有效量的 rAAV/CAG - STAP 载体，以治疗受试者中的肝硬化。本发明还提供了预防处于肝硬化危险中的受试者的肝硬化的方法，包括给受试者施用预防有效量的 rAAV/CAG - STAP 载体，以预防受试者中的肝硬化。最后，本发明提供了有关的病毒载体和药物组合物。

1.治疗受试者中的肝硬化的方法，其包括给受试者施用治疗有效量的 rAAV/CAG-STAP 载体，以治疗受试者中的肝硬化。

2.权利要求 1 的方法，其中所述的 rAAV/CAG-STAP 载体会转导肝星状细胞。

3.权利要求 2 的方法，其中所述的肝星状细胞的转导会抑制 α -SMA、胶原 和/或 TGF- β 表达。

4.权利要求 1 的方法，其中所述的 rAAV/CAG-STAP 载体包含大鼠 STAP 序列。

5.权利要求 4 的方法，其中所述的 rAAV/CAG-STAP 载体包含 rAAV/CAG-大鼠 STAP 载体(CCTCC 专利保藏号 V200306)。

6.权利要求 1 的方法，其中所述的 rAAV/CAG-STAP 载体包含人 STAP 序列。

7.权利要求 1 的方法，其中所述的 rAAV/CAG-STAP 载体包含 rAAV/CAG-人 STAP 载体(CCTCC 专利保藏号 V200305)。

8.权利要求 7 的方法，其中所述的受试者是人。

9.权利要求 1 的方法，其中所述的受试者是哺乳动物。

10.权利要求 9 的方法，其中所述的哺乳动物是人。

11.权利要求 1 的方法，其中所述的肝星状细胞的转导会抑制纤维发生、肝细胞的细胞凋亡或二者。

12.权利要求 2 的方法，其中用 STAP 转导肝细胞会降低 ALT 和 AST 水平。

13. 预防或延迟处于肝硬化危险中的受试者的肝硬化发展的方法，其包括给受试者施用预防有效量的 rAAV/CAG-STAP 载体，以预防或延迟肝硬化在受试者中的发展。

14.权利要求 13 的方法，其中所述的 rAAV/CAG-STAP 载体会转导肝星状细胞。

15.权利要求 14 的方法，其中所述的肝星状细胞的转导会抑制 α -SMA、胶原和/或 TGF- β 表达。

16.权利要求 13 的方法，其中所述的 rAAV/CAG-STAP 载体包含大鼠 STAP 序列。

17.权利要求 16 的方法，其中所述的 rAAV/CAG-STAP 载体包含

rAAV/CAG-大鼠 STAP 载体(CCTCC 专利保藏号 V200306)。

18.权利要求 13 的方法，其中所述的 rAAV/CAG-STAP 载体包含人 STAP 序列。

19.权利要求 18 的方法，其中所述的 rAAV/CAG-STAP 载体包含 rAAV/CAG-人 STAP 载体(CCTCC 专利保藏号 V200305)。

20.权利要求 12 的方法，其中所述的受试者是哺乳动物。

21.权利要求 20 的方法，其中所述的哺乳动物是人。

22.权利要求 13 的方法，其中所述的肝星状细胞的转导会抑制纤维发生、肝细胞的细胞凋亡或二者。

23.权利要求 14 的方法，其中用 STAP 转导肝细胞会降低 ALT 和 AST 水平。

24.治疗患有肝硬化的受试者中的肝硬化的方法，其包括给受试者施用治疗有效量的能编码星状细胞活化-相关蛋白(STAP)的基因，以治疗受试者中的肝硬化。

25. 预防或延迟处于肝硬化危险中的受试者的肝硬化发展的方法，其包括给受试者施用预防有效量的能编码星状细胞活化-相关蛋白(STAP)的基因，以预防或延迟肝硬化在受试者中的发展。

26.病毒载体，其包含 rAAV/CAG-大鼠 STAP 载体(CCTCC 专利保藏号 V200306)。

27.一种试剂盒，其包含权利要求 25 的病毒载体和使用说明书。

28.病毒载体，其包含 rAAV/CAG-人 STAP 载体(CCTCC 专利保藏号 V200305)。

29.一种试剂盒，其包含权利要求 27 的病毒载体和使用说明书。

30. 一种药物组合物，其包含权利要求 26 的病毒载体和药学上可接受的载体。

31. 一种药物组合物，其包含权利要求 28 的病毒载体和药学上可接受的载体。

32.治疗受试者中的肝硬化的方法，其包括给受试者施用治疗有效量的包含抗氧化剂基因的病毒载体，以治疗受试者中的肝硬化。

33.权利要求 32 的方法，其中所述的病毒载体转导肝星状细胞。

34.权利要求 32 的方法，其中所述的抗氧化剂基因是过氧化氢

酶。

35.权利要求 32 的方法，其中所述的抗氧化剂基因是 SOD。

36.权利要求 32 的方法，其中所述的抗氧化剂基因是 STAP。

用于预防和治疗肝硬化的组合物和方法

本申请要求 2003 年 5 月 28 日提交的美国临时申请号 60/473,992 的优先权，其内容在这里引入本申请作为参考。

在本申请中，用括弧中的作者名和日期参考各种出版物。这些出版物的完整引用参见权利要求之前的说明书末尾部分。为了更充分地描述到本文所述的和要求保护的发明的日期为止技术人员已知的技术的状况，将这些出版物的公开内容整体引入本申请中作为参考。

发明背景

肝硬化是一种世界范围的健康问题。它是纤维瘢痕形成的不可逆的最终结果，且其特征在于再生小结和纤维变性组织的正常肝结构的弥散性结构破坏(Lee, 1997)。它已经成为病死的主要原因之一。

肝硬化是由慢性肝损伤产生的疾病。损伤可能是中毒性的(长期醇摄入)、感染性的(病毒性肝炎，主要由乙型肝炎病毒和/或丙型肝炎病毒造成)、免疫学的(原发性胆汁性肝硬变)、通过胆道阻塞(继发性胆汁性肝硬变)、代谢的(Wilson 氏病)。所有形式的肝硬化具有共同特征：胞外基质(ECM)蛋白的合成和过度沉积，主要是胶原 I 和更小程度的胶原 IV 和 III，和随后的肝细胞小结的形成、异常的血管形成和门静脉高血压。这些病理生理学过程导致血液供给的变化，且结果造成肝细胞营养的变化。不管病原和形态学差异如何，所有形式的肝硬化都具有共同的结果，即造成患者死亡的肝衰竭。

由于广泛发生的慢性肝炎和明显缺乏肝纤维化的确定疗法，导致了肝硬化发生率的提高。据估计，世界范围内有 3.5 亿人患有慢性 HBV 感染 (Xu 等, 2003b; Ueki 等, 1999)。在东南亚、非洲和中国，超过 50% 的人口受到感染，且 8% 至 15% 已经变成慢性感染。在这些地区，慢性 HBV 感染是最高达 50% 肝硬化病例的原因(Xu 等, 2003b; Ueki 等, 1999)。产生的肝结构畸变会破坏肝细胞的功能，从而造成威胁生命的全身并发症。

常规疗法仍然不可治疗肝硬化。载体开发的最近进展已经预兆了一种可能的治疗(Lee, 1997; Rudolph 等, 2000)。但是，治疗性基因(例

如肝生长因子(HGF) (Ueki 等, 1999)和端粒酶基因(Rudolf 等, 2000))的致癌潜力可能阻止它们在人类中的应用。合适的用于临床实验的治疗性基因的可用性, 会极大地促进肝硬化的新疗法的开发。

最近, 从纤维变性的肝和星状细胞中分离出了新的内源的过氧化物酶基因、星状细胞活化-相关蛋白(STAP)。已经指出了 STAP 在异化过氧化氢和脂质氢过氧化物方面的潜力(Kawada 等, 2001)。由于已经报道二者都能触发 HSC 活化, 且可以随后促进肝纤维化的发展, 所以肝星状细胞 (HSC)的活化是肝硬化发展的一个关键步骤。认为在 HSC 的活化过程中, 氧化应激在转录因子的活化中起重要作用。下面的实验细节描述了 STAP 如何在肝硬化的发展过程中作为抗纤维变性的过氧化物清除剂起作用, 并证实了 STAP 作为用于预防或逆转恶化的纤维化的治疗性基因的潜力, 所述的纤维化是硬化的肝的最明显的标志。在该研究中, 体内和原代培养方法互补地用于鉴别星状细胞活化的调节机理。结果提供了肝硬化的新的替代治疗方法。

已经从许多物种(包括灵长类动物)中分离出了腺伴随病毒(AAV)。它们属于小 DNA 病毒科, 且具有单链 DNA 基因组。关于它的复制生活周期, AAV 需要辅助病毒(例如腺病毒)的存在来进行复制。在没有辅助病毒的情况下, AAV 会整合进宿主基因组中, 并保持潜伏。当潜伏地感染的细胞遇到辅助病毒的感染时, 整合的 AAV 基因组会自救, 并经历生产性的裂解周期。近年来, 几项研究已经证实了 rAAV 基因送递系统在治疗多种人和动物疾病中的功效。

AAV 具有几项特征, 它们使其特别适用于基因治疗。它是缺陷型的、辅助依赖性的病毒, 且野生型的 AAV 在人和其它物种中是不致病的。可以生产完全没有辅助病毒的载体。去除了整个编码序列的重组 AAV 载体仅仅剩下 145-个碱基对的末端重复序列。因此, 这些载体缺乏所有的病毒基因, 使重组和病毒基因表达的可能性最小化。尽管 AAV 可以诱导免疫学反应, 但与伴随早代腺病毒载体的炎症相比, 它们是相对温和的。AAV 载体的主要优点包括稳定的整合、低免疫原性、长期表达和感染分裂的和未分裂的细胞的能力; 主要限制包括 AAV 在不同的细胞类型中的感染性的差异和可以包装的重组基因组的大小。但是, 以前的研究已经证实, AAV 在肝基因治疗中可以是有效的。更具体地, Xu 等已经显示, 通过肝门静脉注射施用的

AVV 颗粒可以在肝中产生高拷贝数和转基因的稳定表达(Xu 等, 2001)。

至今尚未开发出有效的肝硬化治疗。需要将最佳启动子和基因递送系统与适当的治疗性基因相组合, 来开发非常有效的治疗性的和安全的基因递送系统, 以治疗肝纤维发生、预防慢性炎症和预防硬变组织的积累。下面公开的实验细节提供了预防和治疗肝硬化的新方法。

发明概述

本发明提供了治疗受试者中的肝硬化的方法, 包括给受试者施用治疗有效量的 rAAV/CAG-STAP 载体, 以治疗受试者中的肝硬化。

本发明还提供了预防或延迟处于肝硬化危险中的受试者的肝硬化发展的方法, 包括给受试者施用预防有效量的 rAAV/CAG-STAP 载体, 以预防或延迟发展。

本发明还提供了治疗患有肝硬化的受试者中的肝硬化的方法, 包括给受试者施用治疗有效量的能编码星状细胞活化-相关蛋白(STAP)的基因, 以治疗受试者中的肝硬化。

本发明还提供了预防或延迟处于肝硬化危险中的受试者的肝硬化发展的方法, 包括给受试者施用预防有效量的能编码星状细胞活化-相关蛋白(STAP)的基因, 以预防或延迟受试者中的肝硬化。

本发明还提供了第一种病毒载体, 其包含 rAAV/CAG-大鼠 STAP 载体(CCTCC 专利保藏号 V200306)。

本发明还提供了一种试剂盒, 其包含本发明的第一种病毒载体和使用说明书。

本发明还提供了第二种病毒载体, 其包含 rAAV/CAG-人 STAP 载体(CCTCC 专利保藏号 V200305)。

本发明还提供了一种试剂盒, 其包含本发明的第二种病毒载体和使用说明书。

本发明还提供了第一种药物组合物, 其包含本发明的第一种病毒载体和药学上可接受的载体。

本发明还提供了第二种药物组合物, 其包含本发明的第二种病毒载体和药学上可接受的载体。

最后, 本发明提供了治疗受试者中的肝硬化的方法, 包括给受试

者施用治疗有效量的包含抗氧化剂基因的病毒载体,以治疗受试者中的肝硬化。

附图简述

图 1A-1H

图 1A 和 1B. rAAV/CAG-STAP 载体图: (A) rAAV/CAG-大鼠 STAP (CCTCC 专利保藏号 V200306) 和(B) rAAV/CAG-人 STAP (CCTCC 专利保藏号 V200305)。图 1C 和 1D. 由 DIG 免疫检测试剂盒测得的肝切片的原位杂交: (1C) 未转导的大鼠和 (1D) 用 rAAV/CAG-大鼠 STAP 转导了 1 个月的大鼠。图 1E-1H. 肝切片的免疫组织化学染色,所述切片来自(1E)用 rAAV/CAG-EGFP 转导的大鼠, (1F) 未转导的大鼠(即,用 PBS 处理的大鼠), (1G)用 rAAV/CAG-大鼠 STAP 转导的大鼠, 和(1H)用 rAAV/CAG-人 STAP 转导 10 周的大鼠。

图 2A-2F

(图 A 和 B)未转导的大鼠和未用 CCl₄ 处理的肝, (图 C 和 D) 未转导的和 CCl₄ 处理的(8 周)大鼠的肝, (图 E 和 F)用 rAAV/CAG-大鼠 STAP 转导 2 周、然后用 CCl₄ 处理 8 周的大鼠的肝。

图 3A-3J

图 3A-3D. Masson 氏三色染色的肝切片, 其来自(A) 未转导的且未用 CCl₄ 处理的大鼠, (B) 用 3×10^{11} rAAV/EGFP 颗粒/动物转导、然后用 CCl₄ 处理 8 个连续周的大鼠, (C) 用 CCl₄ 处理 8 个连续周的大鼠, 和(D)用 3×10^{11} rAAV/CAG-大鼠 STAP 颗粒/动物转导 2 周、然后用 CCl₄ 处理 8 周的大鼠。图 3E. 使用图像分析技术分析纤维化, 计算结缔组织与肝的总面积的比率, 所述的肝来自未转导的且未用 CCl₄ 处理的大鼠, 用 3×10^{11} rAAV/CAG-大鼠 STAP 颗粒/动物转导 2 周、然后用 CCl₄ 处理 8 周的大鼠, 用 3×10^{11} rAAV/EGFP 颗粒/动物转导、然后用 CCl₄ 处理 8 周的大鼠, 和未转导的用 CCl₄ 处理 8 周的大鼠。将值表示为平均值 \pm 标准差。图 3F. RT-PCR 分析从不同实验动物的肝中提取的总 RNA 样品中的 PC-1 mRNA 水平(泳道 1 和 2: 未转导的且未用 CCl₄ 处理的大鼠, 泳道 3 和 4: 未转导的和 CCl₄ 处理的(8 周)大鼠, 泳道 5 和 6: 用 rAAV/CAG-人 STAP 颗粒转导 2 周、然后用 CCl₄ 处理 8 周的大鼠, 泳道 7 和 8: 用 rAAV/CAG-大鼠 STAP 颗粒转

导 2 周、然后用 CCl₄ 处理 8 周的大鼠)。图 3G. RT-PCR 分析从不同实验动物的肝中提取的总 RNA 样品中的 PC-3 mRNA 水平(泳道 1:用 rAAV/CAG-人 STAP 颗粒转导 2 周、然后用 CCl₄ 处理 8 周的大鼠, 泳道 2:用 rAAV/CAG-大鼠 STAP 颗粒转导 2 周、然后用 CCl₄ 处理 8 周的大鼠, 泳道 3: 未转导的和 CCl₄ 处理的(8 周)大鼠, 和泳道 4: 未转导的且未用 CCl₄ 处理的大鼠)。图 3H. RT-PCR 分析从不同实验动物的肝中提取的总 RNA 样品中的 T11 mRNA 水平(泳道 1:用 rAAV/CAG-人 STAP 颗粒转导 2 周、然后用 CCl₄ 处理 8 周的大鼠, 泳道 2:用 rAAV/CAG-大鼠 STAP 颗粒转导 2 周、然后用 CCl₄ 处理 8 周的大鼠, 泳道 3: 未转导的和 CCl₄ 处理的(8 周)大鼠, 和泳道 4: 未转导的且未用 CCl₄ 处理的大鼠)。图 3I 和 3J. 从肝取出的切片的 TUNEL 染色, 所述的肝来自(I)用 rAAV/CAG-大鼠 STAP 颗粒转导、然后用 CCl₄ 处理的大鼠, 和(J) 未转导的、用 CCl₄ 处理的大鼠。

图 4A-4H

图 4A-4E. 肝切片, 其取自用 CCl₄ 处理 8 周、然后(4A、4C 和 4E)用 PBS 处理或(4B、4D 和 4F)用 rAAV/CAG-大鼠 STAP 颗粒转导的大鼠。用 TGF- β 1 抗体(图 4A 和 4B)、 α -SMA 抗体(图 4C 和 4D)和 PNCA 抗体(图 4E 和 4F)进行的免疫染色。用 α -SMA 抗体进行的肝提取物的蛋白印迹分析(图 4G; 泳道 1: 未转导的且未用 CCl₄ 处理的大鼠, 泳道 2:用 rAAV/CAG-大鼠 STAP 颗粒转导 2 周、然后用 CCl₄ 处理 8 周的大鼠, 泳道 3:用 rAAV/CAG-人 STAP 颗粒转导 2 周、然后用 CCl₄ 处理 8 周的大鼠, 泳道 4:用 rAAV/CAG-EGFP 颗粒转导 2 周、然后用 CCl₄ 处理 8 周的大鼠, 和泳道 5: 用 PBS 处理 2 周、然后用 CCl₄ 处理 8 周的大鼠), 用 TGF- β 1 抗体进行的肝提取物的蛋白印迹分析(图 4H; 泳道 1: 未转导的且未用 CCl₄ 处理的大鼠, 泳道 2: 用 rAAV/CAG-大鼠 STAP 颗粒转导 2 周、然后用 CCl₄ 处理 8 周的大鼠, 泳道 3:用 rAAV/CAG-EGFP 颗粒转导 2 周、然后用 CCl₄ 处理 8 周的大鼠, 和泳道 4: 用 rAAV-CAG-EGFP 转导 2 周、然后用 CCl₄ 处理 8 周的大鼠)。

图 5A-5G

在未转导的且未用 CCl₄ 处理的大鼠, rAAV/CAG-大鼠 STAP 转导的、用 CCl₄ 处理的大鼠, rAAV/CAG-人 STAP 转导的、用 CCl₄ 处

理的大鼠, rAAV/EGFP 转导的、用 CCl₄ 处理的大鼠和未转导的、用 CCl₄ 处理的大鼠中的 ALT (图 5A 和 5C) 和 AST (图 5B 和 5D) 的水平。图 5E 和 5F. 用 rAAV/EGFP (图 5E) 或用 rAAV/CAG-大鼠 STAP (图 5F) 颗粒转导 2 天的原代星状细胞的免疫染色。在转导之前, 在 37 °C 培养细胞 3 天。仅仅在 rAAV/CAG-大鼠 STAP 转导的原代星状细胞中观察到了 STAP 阳性的细胞(黑色)。图 5G. RT-PCR 分析从不同实验动物的肝中提取的总 RNA 中的 Zf9 mRNA 水平。泳道 1 和 2: 未转导的且未用 CCl₄ 处理的大鼠, 泳道 3 和 4: 用 PBS 处理 2 周、然后用 CCl₄ 处理 8 周的大鼠, 泳道 5 和 6: 用 rAAV/CAG-人 STAP 颗粒转导 2 周、然后用 CCl₄ 处理 8 周的大鼠, 泳道 7 和 8: 用 rAAV/CAG-大鼠 STAP 颗粒转导 2 周、然后用 CCl₄ 处理 8 周的大鼠。

图 6A-6K

rAAV-2 介导的原代 HSC 体外-rAAV/CAG-STAP 载体的感染, 所述的载体能编码大鼠(a) 和人(b) STAP。对用 rAAV/eGFP (c) 和 rAAV/rSTAP(d) 转导 2 天的培养的原代 HSC, 进行 STAP 免疫染色; 在 rAAV 转导之前, 培养 HSC 3 天。仅仅在 rAAV/STAP 感染的 HSC 中, 存在 STAP 阳性的细胞(褐色, 约 90%)。 (e) 在正常的和 rAAV/hSTAP 或 rAAV/rSTAP (MOI: 5×10^4) 中 2 天的 STAP 的免疫印迹。 (f) RT-PCR 介导的 TIMP-1 和 TGF- β 1(g) 的定量, 在 Fe/AA 处理的对照和 STAP 转导的 HSC 细胞中进行。 (h) c-jun 的免疫印迹指示着 STAP 介导的 Fe/AA 的抑制诱导的 c-Jun 蛋白水平的提高。在不用或用能编码大鼠或人 STAP 的 rAAV 载体预先感染的情况下, AP-1 (i) 或 NF- κ B (j) 在正常的 HSC 和 Fe/AA 处理的 HSC 中的结合活性的电泳凝胶迁移率变动分析。 (k) STAP 在大鼠肝组织裂解物中的免疫印迹表明, 在正常的大鼠肝样品中没有可检测水平的单体 STAP, 但是, 在不用或用 rAAV/rSTAP 载体预先感染的情况下, 在 CCl₄ 处理的大鼠肝样品中存在增加水平的单体和二聚体形式的 STAP。

图 7A-7H

由 rAAV-2 载体对 HSC 的体内转导-通过碱性磷酸酶 NBT-BCIP 检测试剂盒(BM)对肝切片中的 STAP RNA 转录物的 DIG-非放射性的原位杂交组织化学(ISHH): 正常的大鼠(a) 和感染 rAAV/rSTAP (rSTAP) 后 1 个月的大鼠(b)。箭标指示着阳性染色的细胞。使用抗

STAP (在 c、e-h 中的绿色) 和结蛋白(Sigma, 在 d-h 中的红色)或二者 (在 c、e、g 和 h 中的黄色)的抗体, 在用 rAAV/rSTAP 载体处理后 1 个月的正常大鼠(c) (d-g 来自相同的样品; d 和 e 400x, f 和 g, 800x) 和 CCl₄-对照大鼠(h)的肝切片上进行双免疫荧光标记。箭标指示着结蛋白阳性的细胞。使用的第一抗体是小鼠抗-结蛋白抗体(1: 100) 和兔抗-STAP 抗体(1: 200)。第二抗体是 Cy5 缀合的驴抗-小鼠 IgG (1: 100) 和 FITC 缀合的山羊抗-兔 IgG (1: 100)。

图 8A-8J

STAP 基因表达预防了慢性的 CCl₄ 诱导的肝硬化-Masson 氏三色染色的肝切片, 其来自正常的(a), CCl₄- rAAV/eGFP (eGFP) (b), CCl₄-对照(CCl₄) (c) 和 CCl₄-rAAV/rSTAP (rSTAP) (d)大鼠。使用图像分析技术⁶分析纤维化指数(e), 用于计算结缔组织的面积与肝切片的总面积的比率, 所述的肝切片来自正常的对照和 CCl₄ 处理的 2 周前感染了能编码 rSTAP、hSTAP 或 eGFP 的 rAAV-2 载体的动物。将值表示为平均值 ± 标准差。(f) 使用 PC-1 引物, 在一式两份的样品中 RT-PCR 分析从肝中提取的总 RNA。通过 RT-PCR(g)和蛋白印迹(h)分析从正常对照和 CCl₄ 处理的有或没有 rAAV/rSTAP 预先感染的动物分离出的肝样品的 TGF-β1 表达, 如所指示的。用 TGF-β1 抗体免疫染色的肝切片(i: CCl₄-对照; j: CCl₄- rAAV/rSTAP)。

图 9A-9K

通过异位表达 STAP 抑制肝细胞的细胞凋亡和抑制肝硬化的血清学标记-用 α-SMA 抗体免疫染色的肝切片(a: CCl₄-对照; b: CCl₄-rAAV/rSTAP)。肝切片的 TUNEL 染色, 所述的肝切片来自不具有(c) 或具有 rAAV/rSTAP 预先感染(d)的用 CCl₄ 处理的动物。在正常对照和在不用或用 rAAV/rSTAP 预先感染的 CCl₄ 处理的动物中的血清 AST (e) 和 ALT (f)水平。(g) 使用 α-SMA 抗体进行的来自不同动物的肝提取物的蛋白免疫印迹。(i) 通过 EMSA 分析 AP-1 结合活性。实验条件与在 HSC 研究(见图 6)中使用的相同。分别在一式两份的样品中 RT-PCR 评价 TIMP-1 (h)、*c-myc* (j) 和 GST-α 1 或 GST-α 2 (k) 在肝提取物中的转录水平。

图 10A-10C

通过 STAP 的转基因表达, 抑制损伤诱导的肝肥大和纤维变性形

态学 - 从正常的大鼠(a) 和 CCl₄-处理的在 2 周前不用(b) 和或用 rAAV/rSTAP 预先感染(c)的动物分离出的肝的代表性的照片。

图 11A-11H

STAP 基因表达会减弱恶化的肝纤维化——CCl₄-rAAV/eGFP (a, c & e)、CCl₄-rAAV/rSTAP (b & f) 和 CCl₄- rAAV/hSTAP (d)大鼠的肝切片, Masson 氏三色染色(a & b), 用 α -SMA (c: CCl₄-rAAV/eGFP d: CCl₄-rAAV/hSTAP) 和 TGF- β 1 抗体(e: CCl₄-rAAV/eGFP ; f : CCl₄-rAAV/rSTAP)免疫染色。在正常对照和在分别感染了 rAAV/rSTAP、rAAV/hSTAP 或 rAAV/eGFP 后 4 周用 12-周-CCl₄ 处理的大鼠中的血清 AST (g) 和 ALT (h)水平。

图 12A-12D

STAP 施用会减弱胆总管阻塞诱导的肝纤维化的持续进行。Masson 氏三色染色的 BDL-eGFP (A); BDL-PBS (B), 假的(C) 和 BDL-STAP (D)大鼠的肝切片。在胆管结扎前, 分别给雄性 SD 大鼠注射 5×10^{11} rAAV/rSTAP 和 rAAV/eGFP 颗粒/动物 3 天。胆管结扎后 28 天, 处死动物。

图 13A-13D

STAP 在 HSC 中的超表达, 会预防胆管结扎造成的进行性肝损伤。首先使雄性 SD 大鼠暴露于 BDL(12 天) 中, 然后通过门静脉注射 PBS (B)或 rAAV/eGFP (A)或 rAAV/STAP (C, D)载体。rAVV 感染后 12 天 (BDL 动物), 制备了肝切片。Masson 氏三色染色的切片证实了 BDL 诱导的肝损伤的预防。

图 14A-14D

在处死时分离的 HSC 中的 TGF β -1 和 PC-1 mRNA 水平的实时 RT-PCR 分析显示 HSC 在 BDL 动物中的活化的表型, 和 HSC 在 rAAV/rSTAP 感染的动物中的休眠的表型(1: 假操作的; 2: BDL-rAAV/eGFP; 3: BDL-rAAV/rSTAP; 4: 无模板对照)。

图 15A-15F

STAP 在转基因大鼠中的长期效果。Masson 氏三色染色的 CCl₄-rAAV/eGFP (A & B)、正常的(C & D) 和 CCl₄-rAAV/rSTAP (E & F) 和大鼠的肝切片。给 8-周-CCl₄ 处理的大鼠分别注射了 rAAV/rSTAP、rAAV/eGFP, 并用 CCl₄ 连续诱导动物 4 周, 将这些动物和正常的大

鼠都在相同的条件下饲养另外的 40 周，直到处死。

优选实施方案详述

本发明提供了治疗受试者中的肝硬化的方法，包括给受试者施用治疗有效量的 rAAV/CAG-STAP 载体，以治疗受试者中的肝硬化。

在一个具体的实施方案中，rAAV/CAG-STAP 载体会转导肝星状细胞。

在一个具体的实施方案中，肝星状细胞的转导会导致 α -SMA、胶原和/或 TGF- β 表达的抑制。

在一个具体的实施方案中，rAAV/CAG-STAP 载体包含大鼠 STAP 序列。在另一个具体的实施方案中，rAAV/CAG-STAP 载体包含 rAAV/CAG-大鼠 STAP 载体(CCTCC 专利保藏号 V200306)。在另一个具体的实施方案中，rAAV/CAG-STAP 载体包含人 STAP 序列。在另一个具体的实施方案中，rAAV/CAG-STAP 载体包含 rAAV/CAG-人 STAP 载体(CCTCC 专利保藏号 V200305)。

在一个具体的实施方案中，受试者是人。在另一个具体的实施方案中，受试者是哺乳动物。在优选的实施方案中，受试者是人。

在一个具体的实施方案中，肝星状细胞的转导会抑制纤维发生、肝细胞的细胞凋亡或二者。

在另一个具体的实施方案中，用 STAP 转导肝细胞会降低 ALT 和 AST 水平。

本发明还提供了预防或延迟处于肝硬化危险中的受试者的肝硬化发展的方法，包括给受试者施用预防有效量的 rAAV/CAG-STAP 载体，以预防或延迟肝硬化在受试者中的发展。

在一个具体的实施方案中，rAAV/CAG-STAP 载体会转导肝星状细胞。在另一个具体的实施方案中，肝星状细胞的转导导致抑制 α -SMA、胶原和/或 TGF- β 表达。

在一个具体的实施方案中，rAAV/CAG-STAP 载体包含大鼠 STAP 序列。在另一个具体的实施方案中，rAAV/CAG-STAP 载体包含 rAAV/CAG-大鼠 STAP 载体(CCTCC 专利保藏号 V200306)。在另一个具体的实施方案中，rAAV/CAG-STAP 载体包含人 STAP 序列。在另一个具体的实施方案中，rAAV/CAG-STAP 载体包含 rAAV/CAG-

人 STAP 载体(CCTCC 专利保藏号 V200305)。

在一个具体的实施方案中,受试者是哺乳动物。在优选的实施方案中,哺乳动物是人。

在一个具体的实施方案中,肝星状细胞的转导会抑制纤维发生、肝细胞的细胞凋亡或二者。在另一个具体的实施方案中,用 STAP 转导肝细胞会降低 ALT 和 AST 水平。

本发明还提供了治疗患有肝硬化的受试者中的肝硬化的方法,包括给受试者施用治疗有效量的能编码星状细胞活化-相关蛋白(STAP)的基因,以治疗受试者中的肝硬化。

本发明还提供了预防或延迟处于肝硬化危险中的受试者的肝硬化发展的方法,包括给受试者施用预防有效量的能编码星状细胞活化-相关蛋白(STAP)的基因,以预防或延迟肝硬化在受试者中的发展。

本发明还提供了第一种病毒载体,其包含 rAAV/CAG-大鼠 STAP 载体(CCTCC 专利保藏号 V200306)。

本发明还提供了一种试剂盒,其包含本发明的第一种病毒载体和使用说明书。

本发明还提供了第二种病毒载体,其包含 rAAV/CAG-人 STAP 载体(CCTCC 专利保藏号 V200305)。

本发明还提供了一种试剂盒,其包含本发明的第二种病毒载体和使用说明书。

本发明还提供了第一种药物组合物,其包含本发明的第一种病毒载体和药学上可接受的载体。

本发明还提供了第二种药物组合物,其包含本发明的第二种病毒载体和药学上可接受的载体。

最后,本发明提供了治疗受试者中的肝硬化的方法,包括给受试者施用治疗有效量的包含抗氧化剂基因的病毒载体,由此治疗受试者的肝硬化。

在一个实施方案中,病毒载体转导肝星状细胞。在另一个实施方案中,抗氧化剂基因是过氧化氢酶。在另一个实施方案中,抗氧化剂基因是 STAP。

下面阐明了某些其它的定义和实例,其意在辅助理解本发明。

使用本领域的普通技术人员已知的任一种方法和送递系统,可以实现或进行“施用”试剂。可以例如静脉内地、通过脑脊液、经口地、经鼻地、通过植入物、跨粘膜地、经皮地、肌内地和皮下地进行施用。

如本文所使用的,“氨基酸序列”指寡肽、肽、多肽或蛋白序列,和其片段或部分,也指天然产生的或合成的分子。如本文所使用的,在贯穿本说明书中使用下面的标准缩写来指示特定的氨基酸: A=ala=丙氨酸; R=arg=精氨酸; N=asn=天冬酰胺; D=asp=天冬氨酸; C=cys=半胱氨酸; Q=gln=谷氨酰胺; E=glu=谷氨酸; G=gly=甘氨酸; H=his=组氨酸; I=ile=异亮氨酸; L=leu=亮氨酸; K=lys=赖氨酸; M=met=甲硫氨酸; F=phe=苯丙氨酸; P=pro=脯氨酸; S=ser=丝氨酸; T=thr=苏氨酸; W=trp=色氨酸; Y=tyr=酪氨酸; V=val=缬氨酸; B=asx=天冬酰胺或天冬氨酸; Z=glx=谷氨酰胺或谷氨酸。

“构建体”用于指重组核酸,其可以是重组的 DNA 或 RNA 分子,其为了表达特定的核苷酸序列的目的而产生,或者用于构建其它的重组核酸。通常,“构建体”在本文中用于指分离的、重组的 DNA 或 RNA 分子。

如本文所使用的,术语“外源基因”指不是天然地存在于宿主生物或细胞中的基因,或者是人工导入宿主生物或细胞中的基因。

术语“基因”指核酸(例如, DNA)序列,其包含生产多肽或前体必需的编码序列。多肽可以由全长编码序列或编码序列的任意一部分编码,只要能保留所需的全长或片段的活性或功能性质(例如,酶活性、配体结合、信号转导等)即可。术语“基因”包括 cDNA 和基因的基因组形式。基因的基因组形式或克隆含有编码区,其被称作“内含子”或“间插区”或“间插序列”的非编码序列中断。内含子是基因的片段,其被转录成核 RNA (hnRNA); 内含子可以含有调节元件,例如增强子。可以从核或初级转录物中去除或“剪接掉”内含子; 因此在信使 RNA (mRNA) 转录物中不存在内含子。在翻译过程中, mRNA 发挥限定新生多肽的氨基酸序列或顺序的功能。

如本文所使用的,术语“基因表达”指将基因编码的遗传信息通过基因的“转录”(即,通过 RNA 聚合酶的酶促作用)转化成 RNA (例如, mRNA、rRNA、tRNA 或 snRNA)的过程,且对于蛋白编码基因,则通过 mRNA 的“翻译”转化成蛋白。可以在该过程的许多阶段调

节基因表达。“上调”或“活化”指提高基因表达产物(即, RNA 或蛋白)的生产的调节, 而“下调”或“抑制”指降低生产的调节。常常将参与上调或下调的分子(例如, 转录因子)分别称作“活化剂”和“阻遏物”。

如本文所使用的, 术语“基因组”指生物的遗传材料(例如, 染色体)。

如本文所使用的, 术语“体外”指人工环境和发生在人工环境中的过程或反应。体外环境可以由试管和细胞培养物组成但不限于试管和细胞培养物。术语“体内”指天然环境(例如, 动物或细胞)和发生在天然环境中的过程或反应。

如本文所使用的, 术语“感染复数”或“MOI”指在转染或转导宿主细胞的过程中, 整合载体: 宿主细胞的比率。例如, 如果使用 1,000,000 个载体来转导 100,000 个宿主细胞, 则感染复数是 10。该术语的应用不限于包含转导的事件, 反而包括通过诸如脂转染、显微注射、磷酸钙沉淀和电穿孔的方法将载体导入宿主中。

如本文所使用的, “核酸序列”指寡核苷酸或多核苷酸, 和其片段或部分, 和基因组的或合成来源的 DNA 或 RNA, 其可以是单链的或双链的, 且代表着有义链或反义链。类似地, 如本文所使用的, “氨基酸序列”指寡肽、肽、多肽或蛋白序列, 和其片段或部分, 也指天然产生的或合成的分子。

如本文所使用的, “核酸序列”指寡核苷酸或多核苷酸, 和其片段或部分, 和基因组的或合成来源的 DNA 或 RNA, 其可以是单链的或双链的, 且代表着有义链或反义链。“核酸分子”应当指任意的核酸分子, 包括但不限于 DNA、RNA 和其杂合体。形成核酸分子的核酸碱基可以是碱基 A、C、G、T 和 U, 以及它们的衍生物。这些碱基的衍生物是本领域众所周知的, 且示例在 PCR Systems, Reagents and Consumables (Perkin Elmer Catalogue 1996-1997, Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, New Jersey, USA) 中。

短语“药学上可接受的载体”用于指任意的标准的药学上可接受的载体。实例包括但不限于磷酸缓冲盐水、生理盐水和水。

使用药学上可接受的载体将本文公开的用于实现本发明的化合物配制成适于全身施用的剂量, 是在本发明的范围内的。通过合适的

载体选择和合适的生产实践,可以肠胃外地施用本发明的组合物、尤其是配制成溶液的那些,例如通过皮下注射、静脉内注射、通过皮下输注或静脉内输注,例如通过泵。使用本领域众所周知的药学上可接受的载体,可以容易地将化合物配制成适于经口施用的剂量。这样的载体能使本发明的化合物配制成由要治疗的患者经口摄入的片剂、丸剂、胶囊、液体、凝胶、糖浆、膏剂、悬浮液等。

适用于本发明的药物组合物包括组合物,其中包含有效量的活性成分,以实现它的预期目的。有效量的确定充分属于本领域的普通技术人员的能力范围,尤其是参考本文提供的详细公开内容。

除了活性成分外,这些药物组合物可以含有合适的药学上可接受的载体,包括赋形剂和辅料,其有利于将活性化合物加工成可以在药学上使用的制剂。为经口施用而配制的制剂可以是片剂、糖衣片、胶囊或溶液的形式。为了经口施用肽,可以常规地使用例如本领域的普通技术人员众所周知的 Emisphere Technologies 所采用的技术。

可以以本身已知的方式生产本发明的药物组合物,例如,通过常规的混合、溶解、成粒、制作糖衣片、研磨、喷雾干燥、乳化、被囊化、截留或冻干过程。

药学上可接受的载体是本领域的普通技术人员众所周知的,包括但不限于 0.01-0.1 M 且优选 0.05 M 磷酸盐缓冲液、磷酸缓冲盐水或 0.9% 盐水。另外,这样的药学上可接受的载体可以包括但不限于含水的或不含水的溶液、悬浮液和乳状液。不含水溶剂的实例是丙二醇、聚乙二醇、植物油例如橄榄油 和可注射的有机酯例如油酸乙酯。含水载体包括水、醇/水溶液、乳状液或悬浮液、盐水和缓冲介质。肠胃外的载体包括氯化钠溶液、林格氏葡萄糖、葡聚糖和氯化钠、乳酸酯化的林格溶液或固定油。静脉内的载体包括流体和营养补充物 (replenisher)、电解质补充物,例如以林格氏葡萄糖等为基础的那些。也可以存在防腐剂和其它的添加剂,例如,抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂、惰性气体等。

用于肠胃外施用的药物制剂包括水溶性形式的活性化合物的水溶液。另外,可以将活性化合物的乳状液和悬浮液制备成适当的油性的注射混合物。合适的亲脂的溶剂或载体包括脂肪油例如芝麻油,或合成的脂肪酸酯,例如油酸乙酯或甘油三酯、脂质体或本领域已知的

用于制备脂质或亲脂的乳状液的其它物质。含水的注射悬浮液可以含有能提高悬浮液的粘度的物质，例如羧甲基纤维素钠、山梨醇或葡聚糖。任选地，悬浮液也可以含有合适的稳定剂或能提高化合物的溶解度的试剂，以制备高浓度的溶液。

通过组合活性化合物和固体赋形剂，任选地研磨得到的混合物，并在加入合适的辅料后（如果需要），加工颗粒的混合物，得到片剂或糖衣片核心，可以得到经口使用的药物制剂。合适的赋形剂具体是填充剂例如糖，包括乳糖、蔗糖、海藻糖、甘露醇或山梨醇；纤维素制剂，例如，玉米淀粉、小麦淀粉、大米淀粉、马铃薯淀粉、明胶、黄蓍树胶、甲基纤维素、羟丙基甲基-纤维素、羧甲基纤维素钠和/或聚乙烯吡咯烷酮(PVP)。如果需要，可以加入崩解剂，例如交联的聚乙烯吡咯烷酮、琼脂或藻酸或其盐例如藻酸钠。

为糖衣片核心提供了合适的包衣。为此目的，可以使用浓糖溶液，其可以任选地含有阿拉伯胶、滑石、聚乙烯吡咯烷酮、卡波泊尔凝胶、聚乙二醇、和/或二氧化钛、紫胶漆溶液和合适的有机溶剂或溶剂混合物。可以将染料或颜料加入片剂或糖衣片包衣，以识别或表征活性化合物剂量的不同组合。

可以经口使用的药物制剂包括由明胶制成的推入契合胶囊，以及由明胶和增塑剂制成的软的、密封胶囊，例如甘油或山梨醇。推入契合胶囊可以含有活性成分，其与填充剂例如乳糖，粘合剂例如淀粉，和/或润滑剂例如滑石或硬脂酸镁和任选的稳定剂相混合。在软胶囊中，活性化合物可以溶解或悬浮在合适的液体中，例如脂肪油、液体石蜡或液体聚乙二醇。另外，可以加入稳定剂。

“受试者”应当指任意的动物，例如灵长类动物、小鼠、大鼠、豚鼠或兔。在优选的实施方案中，受试者是人。

“治疗有效量”指足以治疗患有障碍或与障碍有关的并发症的受试者的量。例如，术语“治疗有效量”可以指能成功地预防肝纤维化的症状和/或减轻症状的严重性的化合物或制剂的量。治疗性组合物的有效量可以取决于许多因素，包括受试者的年龄、免疫状况、种族和性别，纤维变性状况的严重性和造成生物变异性的其它因素。

调节元件可以是组织特异性的或细胞特异性的。当应用于调节元件时，术语“组织特异性的”指该调节元件能指导目标核苷酸序列选

择性地表达于特定的组织类型(例如,肝),在不同类型的组织(例如,肺)中,相对缺少相同目标核苷酸序列的表达。

通过例如将报道基因可操作地连接到启动子序列(它不是组织特异性的)和调节元件上,产生报道构建体,从而将报道构建体导入动物的基因组中,以使报道构建体整合进产生的转基因动物的每个组织中,并检测报道基因在转基因动物的不同组织中的表达(例如,检测mRNA、蛋白或由报道基因编码的蛋白的活性),可以评价调节元件的组织特异性。在一种或多种组织中检测到的报道基因的表达水平比在其它组织中的报道基因的表达水平更高,表明该调节元件是对检测到了更高表达水平的组织“特异性的”。因而,如本文所使用的,术语“组织特异性的”(例如,肝特异性的)是相对的术语,它不要求绝对的表达特异性。换言之,术语“组织特异性的”不要求一种组织具有极其高水平的表达,且另一种组织不表达。只要一种组织中的表达比另一种组织更高即可。相反地,“严格的”或“绝对的”组织特异性的表达是指,在单一组织类型(例如,肝)中表达,而在其它组织中没有可检测的表达。

当应用于调节元件时,术语“细胞类型特异性的”指该调节元件能指导目标核苷酸序列在特定类型的细胞中选择性地表达,在相同组织的不同类型的细胞中,相对缺少相同目标核苷酸序列的表达。当应用于调节元件时,术语“细胞类型特异性的”也指该调节元件能促进目标核苷酸序列在单一组织内的区域中选择性表达。

使用本领域众所周知的方法(例如,免疫组织化学染色和/或RNA印迹分析),可以评价调节元件的细胞类型特异性。简而言之,对于免疫组织化学染色,将组织切片包埋在石蜡中,并使石蜡切片与对多肽产物特异性的第一抗体反应,所述的多肽产物由调节元件调节其表达的目标核苷酸序列编码。

“转导”用于指使用病毒载体将遗传材料导入细胞中。

如本文所使用的,“转导的细胞”来自转导过程,且含有它在转导过程之前不含有的遗传材料,无论是否是稳定整合的。如在一些现有技术中所使用的,但是不象本文所使用的,“转导的细胞”可以指由转导过程产生的细胞群体,且该群体包括含有遗传材料的细胞和不含遗传材料的细胞,无论是否是稳定整合的。

转染指不使用病毒载体将遗传材料导入细胞中。转染的实例包括没有病毒外壳或被膜的“裸”DNA或在脂质体中的DNA的插入。

“治疗”障碍应当指减慢、停止或逆转障碍和/或相关的并发症的进展。在优选的实施方案中，“治疗”障碍指逆转障碍的进展，理想地达到消除障碍本身的程度。如本文所使用的，在上下文中，“改善”和“治疗”是等同的。

如本文所使用的，“载体”应当指本领域已知的所有核酸载体。这样的载体包括但不限于质粒载体、粘粒载体和噬菌体载体。例如一类载体使用源自动物病毒的DNA元件，例如动物乳头瘤病毒、多瘤病毒、腺病毒、痘苗病毒、杆状病毒、逆转录病毒(RSV、MMTC或MoMLV)塞姆利基森林病毒或SV40病毒。

如本文所使用的，术语“载体”指所有遗传元件，例如质粒、噬菌体、转座子、粘粒、染色体、病毒、病毒体等，当与合适的控制元件结合时，其能复制，且可以在细胞之间转移基因序列。因而，该术语包括克隆和表达载体，以及病毒载体。

如本文所使用的，术语“整合载体”指其向核酸(例如,染色体)中的整合或插入是通过整合酶完成的载体。“整合载体”的实例包括但不限于逆转录病毒载体、转座子和腺伴随病毒载体。

“病毒载体”在本文中用于指包含能导入细胞中并表达的病毒基因组的全部或一部分的载体。这样的病毒载体可以包括天然的、突变的或重组的病毒。可以修饰病毒载体，以表达目标基因。这样的病毒可以具有RNA或DNA基因组。合适的病毒载体的实例包括逆转录病毒载体(包括慢病毒载体)、腺病毒载体、腺伴随病毒载体和杂合载体。可以使用的载体包括但不限于源自重组的噬菌体DNA、质粒DNA或粘粒DNA的那些。例如，可以使用质粒载体例如pcDNA3、pBR322、pUC 19/18、pUC 118、119和M13 mp系列的载体。噬菌体载体可以包括λgt10、λgt11、λgt18-23、λZAP/R和EMBL系列的噬菌体载体。可以使用的粘粒载体包括但不限于pJB8、pCV 103、pCV 107、pCV 108、pTM、pMCS、pNNL、pHSG274、COS202、COS203、pWE15、pWE16和charomid 9系列的载体。

或者，可以工程改造重组的病毒载体，包括但不限于源自下述病毒的那些：例如疱疹病毒、逆转录病毒、痘苗病毒、腺病毒、腺伴随

病毒或牛乳头瘤病毒,植物病毒,例如烟草花叶病毒和杆状病毒。如本文所使用的,术语“整合的”指载体稳定地插入宿主细胞的基因组(即,染色体)中。

如本文所使用的,术语“逆转录病毒”指能进入细胞(即,该颗粒含有膜结合蛋白,例如被膜蛋白或病毒 G 糖蛋白,其能结合于宿主细胞表面,并促进病毒颗粒进入宿主细胞的细胞质)并将逆转录病毒基因组(作为双链前病毒)整合进宿主细胞的基因组中的逆转录病毒颗粒。术语“逆转录病毒”包括肿瘤病毒亚科(Oncovirinae)(例如,莫洛尼鼠类白血病病毒(MoMOLV)、莫洛尼鼠类肉瘤病毒(MoMSV)和小鼠乳腺瘤病毒(MMTV),泡沫病毒亚科(Spumavirinae)和慢病毒亚科(Lentivirinae)(例如,人免疫缺陷病毒、猿猴免疫缺陷病毒、马传染性贫血病毒和山羊关节炎-脑炎病毒;见例如,美国专利号 5,994,136 和 6,013,516,二者都在这里引作参考)。

如本文所使用的,术语“逆转录病毒载体”指已经修饰、以表达目标基因的逆转录病毒。可以使用逆转录病毒载体,通过采用病毒感染方法,来将基因有效地转移进宿主细胞中。可以将克隆(即,使用分子生物学技术插入)进逆转录病毒基因组中的外来的或异源的基因有效地送递给易受逆转录病毒感染的宿主细胞。通过众所周知的遗传操作,可以破坏逆转录病毒基因组的复制能力。可以使用得到的复制缺陷的载体来将新的遗传材料导入细胞中,但是它们不能复制。可以使用辅助病毒或包装细胞系来允许载体颗粒装配和从细胞放出。这样的逆转录病毒载体包含复制缺陷的逆转录病毒基因组,其含有能编码至少一种目标基因的核酸序列(即,多顺反子的核酸序列可以编码超过一种目标基因)、5'逆转录病毒长末端重复序列(5'LTR);和 3' 逆转录病毒长末端重复序列(3'LTR)。

术语“假型的逆转录病毒载体”指含有异源膜蛋白的逆转录病毒载体。术语“膜结合蛋白”指与围绕着病毒颗粒的膜结合的蛋白(例如,弹状病毒科(Rhabdoviridae)病毒的病毒被膜糖蛋白或 G 蛋白,例如 VSV、Piry、Chandipura 和 Mokola);这些膜结合蛋白会介导病毒颗粒进入宿主细胞。膜结合蛋白可以结合特定的细胞表面蛋白受体,正如逆转录病毒被膜蛋白或膜结合蛋白可以与宿主细胞的质膜的磷脂组分相互作用的情况,正如源自弹状病毒科成员的 G 蛋白的情

况。

如本文所使用的，术语“腺伴随病毒(AAV)载体”指源自腺伴随病毒血清型的载体，包括但不限于 AAV-1、AAV-2、AAV-3、AAV-4、AAV-5、AAVX7 等。AAV 载体可以具有一种或多种 AAV 野生型基因，其全部地或部分地缺失优选的 rep 和/或 cap 基因，但是能保持功能性侧翼 ITR 序列。

使用本领域已知的重组技术，可以构建 AAV 载体，以包含一个或多个异源核苷酸序列，其两端(5'和 3')侧接功能性 AAV ITR。在本发明的实践中，AAV 载体可以包含位于异源核苷酸序列上游的至少一个 AAV ITR 和合适的启动子序列，和位于异源序列下游的至少一个 AAV ITR。“重组的 AAV 载体质粒”指一种类型的重组 AAV 载体，其中载体包含质粒。如同通常的 AAV 载体一样，5'和 3' ITR 侧接选择的异源核苷酸序列。

AAV 载体也可以包含转录序列，例如多腺苷酸化位点，以及选择性标记或报道基因，增强子序列，和能诱导转录的其它控制元件。上面描述了这样的控制元件。

如本文所使用的，术语“AAV 病毒体”指完整的病毒颗粒。AAV 病毒体可以是野生型 AAV 病毒颗粒(包含线性的、单链 AAV 核酸基因组，其与 AAV 衣壳、即蛋白外壳有关)或重组的 AAV 病毒颗粒(下面描述)。在这点上，可以将单链 AAV 核酸分子(有义/编码链或反义/反编码链，如通常定义的那些术语)包装进 AAV 病毒体中；有义和反义链是同等地感染性的。

如本文所使用的，将术语“重组的 AAV 病毒体”或“rAAV”定义为感染性的、复制缺陷型病毒，其由包裹异源核苷酸序列的 AAV 蛋白壳(即，围绕着蛋白外壳)组成，所述异源核苷酸序列又在 5'和 3'侧接 AAV ITR。本领域已知许多构建重组的 AAV 病毒体的技术(见例如，美国专利号 5,173,414；WO 92/01070；WO 93/03769；它们都在这里引作参考)。

用于 AAV 载体的合适的核苷酸序列(和，实际上，本文所述的任何载体)包括所有功能上有关的核苷酸序列。因而，本发明的 AAV 载体可以包含任意的需要的基因，其能编码具有需要的预防或逆转肝硬化的生物学或治疗效果的抗氧化剂基因(例如，STAP 和过氧化氢

酶)。

“腺伴随病毒末端反向重复序列”或“AAV ITR”指本领域公知的在 AAV 基因组的每个末端发现的回文区,其作为 DNA 复制的起点和作为病毒包装信号一起顺式起作用。为了本发明的用途,侧翼 AAV ITR 位于一个或多个选定的异源核苷酸序列的 5'和 3',且与 rep 编码区或 Rep 表达产物一起将选择的序列整合进靶细胞的基因组中。

关于 AAV-2 序列, AAV ITR 区的核苷酸序列是已知的(见例如, Kotin, *Human Gene Therapy* 5: 793-801 [1994]; Bems, K.I. “Parvoviridae and their Replication” in *Fundamental Virology*, 第 2 版, (B.N.Fields 和 D.M.Knipe 编)。如本文所使用的,“AAV ITR”无需具有所述的野生型核苷酸序列,而是可以进行改变,例如,通过核苷酸的插入、缺失或取代。另外, AAV ITR 可以源自任意的几个 AAV 血清型,包括但不限于 AAV-1、AAV-2、AAV-3、AAV-4、AAV-5、AAVX7 等。侧接选择的异源核苷酸序列的 5'和 3' ITR 不是必须等同于或源自相同的 AAV 血清型或分离物,只要它们能实现目的功能即可,即当存在 rep 基因时(在相同的或不同的载体上),或者当 Rep 表达产物存在于靶细胞中时,能将相关的异源序列整合进靶细胞基因组中。

在本文中将整合病毒载体定义为能将它们的全部或部分遗传材料整合进细胞基因组中的那些。它们包括逆转录病毒载体和 AAV 载体。它们也包括杂合载体,例如腺病毒/逆转录病毒载体和腺病毒/AAV 载体。但是,也可以使用能作为附加体稳定地复制的载体。还理想地在细胞系中高滴度地、以节省成本的方式生产载体,且对患者具有最小的风险,例如不会产生能复制的病毒。

下面的实验细节部分解释了本发明。阐述的该部分用于辅助理解本发明,而无意、且也不应当理解成以任何方式限制下面的权利要求书所述的发明。

实验细节 I

A. 提要

在许多国家,肝硬化是死亡的最常见原因之一。它在世界范围内影响着超过 5%的人口,尤其是处于他们的最有生产力的年龄阶段的

成年人。在这里，我们证实了可以用 rAAV/CAG-STAP 颗粒体外转导 (MOI: 1/1000) 大多数原代星状细胞 (> 60%)。在大鼠中，在用 CCl₄ 处理 8 个连续周之前 2 周，单次注射 rAAV/CAG-STAP，可以明显预防肝硬化。在用 rAAV/CAG-STAP (大鼠或人) 转导的大鼠中的 ALT 和 AST 水平都非常接近未转导的和未用 CCl₄ 处理的大鼠。相反地，在 CCl₄ 处理的已经用 rAAV/CAG-EGFP 转导的或用 PBS 处理的大鼠中，观察到了高 ALT 和 AST 水平。在用 CCl₄ 诱导之前用 rAAV/CAG-STAP (大鼠或人) 颗粒转导的大鼠不仅产生了肝结构的保护，而且产生了肝功能的维持。

STAP 的转导抑制了 α -SMA、胶原 I 和 TGF- β ，一种能刺激星状细胞纤维生成的主要因子，抑制了纤维发生和肝细胞的细胞凋亡，并提高了患有该严重疾病的大鼠的存活率。

STAP 的转导还导致了由 CCl₄ 处理产生的大鼠肝硬化的逆转。在 CCl₄-诱导肝损伤后，用 rAAV/CAG-STAP 颗粒处理 4 周后，ALT 和 AST 的水平急剧降低至非病理学水平。最后，可以将 rAAV/CAG-人 STAP 的表征翻译成用于治疗患有进行性肝硬化的患者的基因治疗的有用的临床实验。

B. 方法

动物：年轻的成年雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠，重约 120 克，恒温圈养，并无限制地供给实验室食物和水。在香港特别行政区 (SAR) 政府的卫生部门 (Department of Health) 和香港大学动物伦理委员会 (University of Hong Kong Animal Ethics Committee) 批准的研究方案下，进行所有的研究。除了未用 CCl₄ 处理的对照外，给所有的无病原体的雄性 SD 大鼠每周 2 次皮下施用 0.5ml/kg CCl₄，其与橄榄油混合成 50% (体积/体积) 的终浓度，持续 8 周。对于预防研究，研究了下面的组 (n=10 只大鼠/组)：用 3×10^{11} rAAV/CAG-STAP (大鼠或人) 颗粒/动物转导了 2 周、然后用 CCl₄ 处理的大鼠；用 3×10^{11} rAAV/EGFP 转导了 2 周、然后用 CCl₄ 处理的大鼠；用 PBS 处理了 2 周、然后用 CCl₄ 处理的大鼠；和未转导的且未用 CCl₄ 处理的大鼠。最后注射后 1 天，用二乙醚麻醉大鼠，并切开腹膜腔。如以前所述 (Xu 等, 2003, 出版中)，进行组织的取出和加工。在分析之前，将肝组织样品保藏在 -80℃。

cDNA 克隆和重组 AAV 载体的产生：使用 Triazol[®] (Life Technologies), 从 100 mg 肝组织提取了 RNA。使用 5.0 µg 总 RNA, 合成了第一链 cDNA, 其由 Oligo dt (0.5 µg, Promega[®]) 启动, 然后使用 SuperScript[®] II RNA 酶 H 逆转录酶(150U; Life Technologies), 在 42℃ 逆转录 90 分钟。使用没有 SuperScript[®] II 的一式两份反应物作为阴性对照。使用胰岛素寡核苷酸引物, In-1, 5'-CAG CCT TTG TGA ACC AAC AC-3' (SEQ ID NO : 1) 和 In-2, 5'-GCG TCT AGT TGC AGT AGT TC-3' (SEQ ID NO : 2) 来生成产物。β-肌动蛋白 cDNA 的分析是 PCR 反应的内部对照。β-肌动蛋白 PCR 的引物是(A-1, 5'-CTC TTC CAG CCT TCC TTC C-3') (SEQ ID NO : 3) 和(A-2, 5'-GTC ACC TTC ACC GTT CCA G-3') (SEQ ID NO : 4)。循环参数是在 94℃ 5 分钟, 随后是在 60℃ 1 分钟和在 72℃ 1 分钟的 40 个循环。扩增后, 通过在含有溴化乙锭溶液(Life Technologies)的 2% 琼脂糖凝胶上的凝胶电泳, 分离了 5 µl PCR 产物, 并用紫外光可视化。通过使用 2 个寡核苷酸引物 5'-ATG GAG AAA GTG CCG GGC GAC-3' (SEQ ID NO : 5) 5'-TGG CCC TGA AGA GGG CAG TGT-3' (SEQ ID NO : 6) 的 PCR, 从 SD 大鼠肝组织克隆了大鼠 STAP cDNA。克隆的大鼠 STAP cDNA 的可读框被插入了 rAAV 构建体的 EcoR1 和 Not 1 位点, 所述的 rAAV 构建体含有 AAV-2 末端反向重复序列(ITR)、CAG 启动子和旱獭乙型肝炎病毒转录后调节元件(WPRE), 以促进表达(Xu 等 Hepatology, 2003, 出版中; 和 Xu 等, 2001)。

包装了能表达 STAP、EGFP 和空颗粒的重组的 AAV 载体, 并如以前所述(Svegliati-Baroni 等, 1999; Xu 等 Hepatology, 2003, 出版中), 进行了肝素柱纯化。

通过 3 种质粒、无辅助病毒的包装方法, 产生了 AAV 颗粒。简而言之, 使用磷酸钙沉淀, 将 rAAV 载体和辅助 pFd H22 转染进 293 细胞中。转染后 70 小时, 收获细胞, 并通过在有 50 单位/ml benzonase (Sigma) 存在的情况下与 0.5% 脱氧胆酸盐一起在 37℃ 温育 30 分钟, 进行裂解。在 5000g 离心后, 经 0.45 µm Acrodisc 针筒式滤器过滤裂解物, 以去除任何颗粒物质。通过肝素亲和柱色谱, 分离了 rAAV 颗粒。在 100 mM NaCl, 1 mM MgCl₂ 和 20 mM 一碱价和二碱价磷酸钠, pH 7.4 中, 透析峰病毒级分。对等分试样进行定量 PCR 分析(AB

Applied Biosystem), 以定量基因组滴度。使用改进的斑点印迹方法进行 PCR Taqman 测定, 其中系列稀释了 AAV, 并依次用 DNA 酶 I 和蛋白酶 K 消化。使用苯酚-氯仿提取病毒 DNA 2 次, 以去除蛋白, 然后用 2.5 当量体积的乙醇进行沉淀。在 10^2 至 10^7 拷贝范围内, 建立了标准扩增曲线, 并得到了与每个起始模板拷贝数对应的扩增曲线。通过商业分析试剂盒(Progen, 德国), 再次确认了病毒颗粒。在动物实验之前, 将病毒颗粒保藏在 -80°C 。

通过 ELISA (Progen, 德国) 测量了所有载体原液的滴度。另外, 通过 ABI Prism 7700TM 序列检测系统, 再次确认了 rAAV/CAG-STAP (大鼠和人) 和 rAAV/CAG-EGFP 载体的滴度。

星状细胞的分离和培养: 如前所述(Kawada 等, 2001), 从未转导的且未用 CCl_4 处理的大鼠以及纤维变性大鼠制备了肝星状细胞。将从未转导的且未用 CCl_4 处理的大鼠或纤维变性的肝分离出的星状细胞分别称作休眠的或体内活化的星状细胞。以 1: 200 的感染复数(MOI)比率, 用 rAAV 病毒颗粒转导了相同组的星状细胞或肝细胞。通过蛋白印迹和免疫化学测定了 STAP 基因表达(Kawada 等, 2001)。在转导后 48 小时, 将 $200\text{ }\mu\text{M}$ 抗坏血酸和 $10\text{ }\mu\text{M}$ FeNTA (终浓度) 加给细胞, 以诱导脂质过氧化作用。使用 LPO-586TM 试剂盒(CalBiochem[®], 美国), 测定了脂质过氧化作用的标记, 例如 MDA 和 4-HNE, 同时通过 MTT 测定估计了花生四烯酸的细胞毒性效应。MTT [3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-联苯-2H-溴化四唑鎓] 测定: 使用多道移液管, 向微量滴定板的每个孔中加入 $50\text{ }\mu\text{l}$ MTT (2mg/ml)。在 37°C 和 $5\%\text{ CO}_2$ 下, 温育平板 4 小时。将每个平板的培养基和 MTT 轻打进废物盆中, 并倒入水池中。使用多道移液管, 向每个平板中加入 $150\text{ }\mu\text{l}$ DMSO。在加入 DMSO 的 10 分钟内, 将平板置于平板读数器上, 并在 595nm 读数。在用 rAAV/CAG-STAP 颗粒转导了星状细胞后, 将星状细胞分成 2 组。在一组中诱导脂质过氧化作用, 但是在另一组中不诱导, 以确定 STAP 清除自由基-衍生的有机过氧化物的效率。

电泳凝胶迁移率变动测定(EMSA): 使用 EMSA 来证实结合特定的共有 DNA 序列的蛋白的活化和转运。使用 T4 多核苷酸激酶(Boehringer-Mannheim) 和 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP (4000Ci/mmol , ICN Costa Mesa, CA, 美国), 标记了 AP-1 蛋白复合物的结合位点 5'-AGC ATG

AGT CAG ACA CCT CTT GGC-3' (SEQ ID NO : 7);或 NK-kB 蛋白复合物的结合位点 5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3' (SEQ ID NO : 8);或 Egr 蛋白复合物的结合位点 5'-GGA TCC AGC GGG GGC GAG CGG GGC GA-3' (SEQ ID NO: 9);或 CEBP 蛋白复合物的结合位点 5'-TGC AGA TTG CGC AAT CTG CA-3' (SEQ ID NO : 10)。对于竞争研究,将 10-100 倍过量的未标记的 AP-1 或 NFkB、Egr 和 CEBP 包含在反应混合物中。用 0.5 ng 标记的探针温育核蛋白 (5 µg)后,将反应混合物在非变性的聚丙烯酰胺凝胶上分离。干燥凝胶,放射自显影,并用 Phospho Imager™ (Bio-Rad®, 美国)测量放射性。使用针对 p65 的亲合性纯化的多克隆抗体 (Santa Cruz Biotechnology®, Santa Cruz, CA),进行抗体凝胶迁移阻滞分析 (supershift) 测定。对于抗体凝胶迁移阻滞分析测定,将核提取物与如上的标记探针一起温育,然后与 1.0 µg 抗体温育另外 1 小时。

RNA 印迹:如以前所述(Ueki 等,1999),进行了 RNA 印迹分析。简而言之,根据生产商的说明书,使用每 100mm 皿 1 ml RNA-STAT-60™ (Tel-Test, Inc, Friendswood, TX),从肝组织提取了总细胞 RNA。在琼脂糖凝胶上,通过凝胶电泳分离了总 RNA,并转移到 ζ -探针® GT 尼龙膜 (Bio-Rad® Laboratories, Richmond, CA, 美国)上。从 AAV/CAG-STAP 质粒上剪切 DNA 片段,并使用随机引物标记试剂盒(Gibco-BRL),用 [³²P] dCTP 进行标记,并用作杂交探针。使用 Biomax MS™ 放射自显影胶片 (Eastman Kodak Co., Rochester, NY),检测杂交信号,并使用 Bio-Rad GS-250 PhosphoImager™ (Bio-Rad, Hercules, CA)进行定量。如以前所述(Ueki 等,1999; Nieto 等,2001; 和 Kawada 等,2001),进行 TGF-β1、TGF-α、TIMP-1、类型-3 和类型 4、MMP-2 和血纤蛋白原 mRNA 的 RNA 印迹分析和杂交条件。使用 5-溴-4-氯-3-吡啶磷酸和氮蓝四唑(Roche Molecular Biochemicals),检测杂交的 cRNA 探针。

原位杂交:将肝切片在 4% 甲醛中固定 7 分钟,并在 PBS 中洗涤 3 分钟,在 2X SSC 中洗涤 10 分钟。在含有 4X SSC、10% 葡聚糖硫酸酯、1X Denhardt 氏溶液、2 mM EDTA、50% 去离子的甲酰胺和 500 µg/ml 鲑鱼精子 DNA 的混合物中,将切片在 37℃ 杂交 24 小时。用 DIG-标记的反义 cRNA 杂交切片。根据 DIG RNA 标记试剂盒

(Boehringer), 进行标记程序。将阴性对照与 DIG-标记的有义 cRNA 杂交。在 0.2X SSC、37℃, 在 60%甲酰胺中进行高严格性杂交后洗涤 15 分钟, 并在 2X SSC、室温, 洗涤 10 分钟。使用 DIG 免疫学检测试剂盒 (Boehringer), 检测杂交。

用于检测 STAP 诱导的基因表达的 RT-PCR 分析: 使用 RNazol B, 从冷冻组织中分离了总 RNA。使用 GeneAmp® RNA PCR Core 试剂盒(PerkinElmer Life Science), 通过逆转录-聚合酶链反应, 测定了每份样品中的 mRNA 表达。使用了下面的引物: c-MET: 5'-GCA CCC CAA AGC TGG TAA TA-3' (正向) (SEQ ID NO : 11), 5'-CCG GTT GAA CGA TCA CTT TT-3' (反向) (SEQ ID NO : 12); HGF: 5'-CGA GCT ATC GCG GTA AAG AC-3' (正向) (SEQ ID NO : 13), 5'-GGT GGT TCC CCT GTA ACC TT-3' (反向) (SEQ ID NO : 14); 前胶原 α 类型-1: 5'-TAC TAC CGG GCC GAT GAT GC-3' (正向) (SEQ ID NO : 15), 5'-TCC TTG GGG TTC GGG CTG ATG TA-3' (反向) (SEQ ID NO : 16); 前胶原 III: 5'-CCC CTG GTC CCT GCT GTG G-3' (正向) (SEQ ID NO : 17), 5'-GAG GCC CGG CTG GAA AGA A-3' (反向) (SEQ ID NO : 18); MMP-13: 5'-AGC TTG GCC ACT CCC TCG GTC TGT G-3' (正向) (SEQ ID NO : 19), 5'-GTC TCG GGA TGG ATG CTC GTA TGC-3' (反向) (SEQ ID NO : 20); TGF- β 1: 5'-TAT AGC AAC AAT TCC TGG CG-3' (正向) (SEQ ID NO : 21) 和 5'-TGC TGT CAC AGG AGC AGT G-3' (反向) (SEQ ID NO : 22); TI1: 5'-CCA CAG ATA TCC GGT TCG CCT ACA-3' (正向) (SEQ ID NO : 23), 5'-GCA CAC CCC ACA GCC AGC ACT A-3' (反向) (SEQ ID NO : 24); WPRE: 5'- GCT AAA GAT TCT TGT ATA AAT CCT GGT TGC TGT CT-3' (正向) (SEQ ID NO : 25), 5'-GCA TCT CGA GGA AGG GAC GTA GCA GAA GAA C-3' (反向) (SEQ ID NO : 26); Zf9: 5'-ACA ACC AGG AAG ACC TGT GG-3' (正向) (SEQ ID NO : 27), 5'-TGC TTT CAA GTG GGA GCT TT-3' (反向) (SEQ ID NO : 28); 和 G3PDH: 5'-CCC TTC ATT GAC CTC AAC TAC ATG G-3' (正向) (SEQ ID NO : 29), 5'-CAT GGT GGT GAA GAC GCC AG-3' (反向) (SEQ ID NO : 30)。肝生长因子(HGF)的受体是由 *c-met* 编码的酪氨酸激酶受体。Zf9 是 Kruppel-类转录因子家族的成

员, 其在熟知的、生物学上重要的肝星状细胞活化背景下诱导。Zf9 的模块结构具有几个有趣的特征, 包括与含有属于胶原 $\alpha 1(1)$ 的 TATA 框的启动子的相互作用。使用 G3PDH 作为内部对照。分析了在肝硬化过程中的转录因子的阻遏和/或抑制, 所述转录因子例如 Sp-1、Zf-9/KLF6、JNK 和 p38(Mendelson 等; 1996)。

TUNEL 染色: 使用原位细胞死亡检测试剂盒TM(Roche Molecular Biochemicals) 的方法, 测定了 rAAV/EGFP 或 rAAV/CAG-STAP 的细胞敏感性。从已经在 4% 低聚甲醛中固定、并包埋在石蜡中的肝组织, 制备了 8 μm 厚的系列切片(Xu 等, 2003, 出版中)。简而言之, 将固定的切片去蜡, 并重新水化, 然后用 0.1% Triton-X100 和 0.1% 柠檬酸钠的溶液进行透化。在平衡缓冲液中封闭 10 分钟后, 将含有 TdT (末端转脱氧核苷酰酶) 和荧光团标记的 dUTP 的反应缓冲液加到切片上, 并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 60 分钟。通过将载玻片转移到 1X SSC 中并在室温温育 15 分钟来终止反应。然后, 在 PBS 中彻底洗涤后, 在 3: 1 Vectashield[®] DAPI 中封固切片, 并用共焦荧光显微镜进行检查。用苏木精和曙红, 对临近的切片进行对染。在 10 个随机选择的视野中, 计数凋亡细胞的总数。将细胞凋亡指数 (AI) 计算为阳性染色细胞的百分比。

$\text{AI} = \text{凋亡细胞的数目} \times 100 / \text{有核细胞的总数}$ 。

免疫组织化学染色和分析: 将肝置于溶于 PBS 中的 30% 蔗糖中, 并在恒冷切片机中切成 20 μm 厚的切片, 并解冻封固到载玻片上。用含有 0.2% Triton-X100 的 PBS 冲洗切片 3 次, 然后在溶于甲醇中的 1% H_2O_2 中温育 1 分钟, 在 PBS 冲洗 3 次, 然后与溶于 PBS 中的 4% 脱脂奶粉温育 1 小时。再次用 PBS-Triton 冲洗后, 将切片与第一抗体在室温温育过夜。用 PBS-Triton 洗涤切片, 然后与第二抗体温育 2 小时, 或浸没在碘化丙啶溶液(Sigma)中 5 分钟。然后, 用 PBS 或蒸馏水冲洗切片, 再用 Vectashield[®] (Vector La, California) 封固。使用 Leica[®] 4d TCS 共焦显微镜, 捕获免疫荧光信号, 并使用 Adobe Photoshop[®] 5.0, 处理图像。通过免疫组织化学, 检查了 TGF- β 1、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、增殖细胞核抗原(PCNA)、前胶原类型 I (PC-1)或 NF- κ β (p50 和 p65)的水平。通过 ELISA 和蛋白印迹, 测量了 TGF- β 1、内皮缩血管肽-1、 α -SMA。如以前报道的(Kawada

等,2001,出版中),生产了 STAP 的多克隆抗体。

通过计数每只大鼠的 3 个不同切片中的超过 2,000 个肝细胞核,确定了 PCNA 标记指数。

Masson 氏三色和 HE 染色:用 Masson 氏三色和苏木素-曙红对石蜡包埋的切片进行染色。使用计算机图像分析技术,在 Masson 氏三色-染色的组织学载玻片上,检测了肝硬化。

进行了组织学检查,以确定实验组中的任何病理学变化,例如实质细胞的破坏、再生小结的形成、纤维间隔的分布、网硬蛋白纤维的扩散、薄纤维变性间隔的形成和实质的小结模式。

通过分析纤维变性组织区域、粘连蛋白、 α -肌动蛋白或胶原 I、肝星状细胞的活性、门脉和全身血压的血流动力学变化、肝的能量变化、蛋白酶抑制剂、再生、丝氨酸蛋白酶和转基因蛋白水平之间的差异以及它们对治疗的和未治疗的动物存活率的总体效果,了解 STAP 在肝硬化过程中的功能。通过具有一些改进的前述的方法(Ueki 等,1999),测定了胶原的合成。

将动物分成 5 组,即,用 3×10^{11} rAAV/CAG-EGFP 颗粒/动物转导、然后用 CCl_4 处理 8 个连续周的大鼠;仅仅用 PBS 处理、然后用 CCl_4 处理 8 个连续周的大鼠;用 3×10^{11} rAAV/CAG-大鼠 STAP 颗粒/动物转导 2 周、然后用 CCl_4 处理 8 周的大鼠;用 3×10^{11} rAAV/CAG-人 STAP 颗粒/动物转导 2 周、然后用 CCl_4 处理 8 周的大鼠;和正常的大鼠(未转导的且未用 CCl_4 处理)。如上所述处理样品。收集血液样品,且在分析之前,将血清保藏在 -80°C 。从已经在液氮中冷冻且保藏在 -80°C 的肝样品,制备了 $6\text{ }\mu\text{m}$ 厚的系列切片。如以前所述(Ueki 等,1999),进行了组织学检查,以确定实验组中的任何病理学变化,例如实质细胞的破坏、再生小结的形成、纤维间隔的分布、网硬蛋白纤维的扩散、薄纤维变性间隔的形成和实质的小结模式。测量了乳糖酶脱氢酶(LDH)活性,并将其视作细胞毒性的指数。使用乳酸脱氢酶测定试剂盒(Sigma),来对比实验组中的细胞毒性的存在。记录每组中的死亡率。

生化分析:在 Queen Mary Hospital, Hong Kong 中,检测了大鼠血液中的血清清蛋白、胆红素、天冬氨酸转氨酶(AST) (EC2.6.1.) 和丙氨酸转氨酶(ALT) (EC 2.6.1.2)活性。使用 LPO-586™试剂盒来测量

脂质过氧化作用 (氧化应激的重要后果)的产生, 例如 MDA 和 4-HNE (CalBiochem, 美国)。

通过改进的 Aguilar-Delfin 等(1996)的技术, 使用全肝匀浆物来测量脯氨酸羟化酶 (EC1.1.1.1)的活性。将过氧化氢酶活性测量为由于 H_2O_2 消耗造成的 240 nm 吸光度的降低。通过测量在没有或有 STAP 存在的情况下, 50 mM PBS 缓冲液中的 HO 在 240 nm 处的降低, 分光光度法地测量了 STAP 的过氧化氢酶(EC 1.11.1.6)活性。根据以前所述(Kawada 等, 2001)的稍作改进的 Kharasch 氏的方法, 测定了脂肪酸氢过氧化物过氧化物酶活性。总氧化自由基清除能力测定是基于人工产生的氧化自由基和 α -keto- γ -methiobutyric acid 之间的反应的, 后者被氧化成乙烯。从所述样品与不含有生物样品的对照反应相比的抑制乙烯形成的能力, 定量了其清除氧化自由基的能力。总氧化自由基清除能力(TOSC)测定是基于人工产生的氧化自由基和 α -keto- γ -meththiolbutyric acid(KMBA)之间的反应的, 后者被氧化成乙烯。对于所有的样品, 通过用实验 TOSC 值除以包含在测定中的相对蛋白浓度, 计算出了比 TOSC 值 (相对于 1 mg 蛋白)。

统计学分析:将数据表示为平均值 \pm SEM, 并使用 Systat[®] 统计软件(Evanston, IL), 通过具有重复测量和 Tukey post-hoc 检验的 ANOVA 进行分析。

C.结果

肝中的 STAP 基因表达

为了评价 STAP 在肝中的异位表达, 用下述颗粒转导了雄性 SD 大鼠: rAAV/CAG-大鼠 STAP 颗粒, 其含有具有 570 个碱基对的可读框, 后者能编码来自大鼠星状细胞活化-相关蛋白的 190 个氨基酸(Genbank 登记号: NM_130744 ; Kawada 等, 2001)(图 1A); 或 rAAV/CAG-人 STAP 颗粒, 其含有具有 573 个碱基对的可读框, 后者能编码来自人星状细胞活化-相关蛋白的 191 个氨基酸(Genbank 登记号: AB057769; Ashahina 等, 2002) (图 1B)。根据布达佩斯条约 (Budapest Treaty) 的条件, 于 2003 年 5 月 16 日, 将 rAAV/CAG-大鼠 STAP 病毒载体和 rAAV/CAG-人 STAP 病毒载体保藏在中国典型培养物中心(CCTCC), 中国湖北省武汉市, 430072, 且分别已经得到了专利保藏登记号 CCTCC-V200306 和 CCTCC-V200305。在

rAAV/CAG-STAP (人或大鼠) 转导后 4 周, 处死大鼠。原位杂交揭示, 与未转导的大鼠组(用 PBS 处理)(图 1C)相反, rAAV/CAG-STAP 转导的大鼠组在肝中表达了 STAP (图 1D)。为了确定 STAP mRNA 是否能有效地翻译成蛋白, 通过免疫-组织化学测量了肝组织中的 STAP 蛋白。与 rAAV/CAG-EGFP (图 1E) 和未转导的大鼠组(图 1F)相反, 来自用 rAAV/CAG-大鼠 STAP (图 1G)或 rAAV/CAG-人 STAP (图 1H) 转导了 10 周的大鼠的肝切片表现出强的 STAP 基因表达。这些结果表明, 通过转导病毒颗粒来导入大鼠或人 STAP, 可以提高这些动物中的转基因的 STAP 的水平。

STAP 基因在肝中的表达预防了肝硬化

为了测试 STAP 作为治疗基因的效用, 尤其是它的预防恶化的纤维化的潜力, 用 rAAV/CAG-大鼠 STAP (n=10 只大鼠)、rAAV/CAG-人 STAP (n=10 只大鼠)或 rAAV/CAG-EGFP (n=10 只大鼠)颗粒转导了雄性 SD 大鼠。以 3×10^{11} 颗粒/动物的浓度, 经门静脉注射送递病毒颗粒 2 周, 然后用或不用 CCl_4 处理 8 周。另一组大鼠(n=6)仅仅用 PBS 处理(未转导的), 然后用或不用 CCl_4 处理 8 周。

用 rAAV/CAG-大鼠 STAP 转导的大鼠的肝结构(图 2E 和 2F; 图 3D)类似于未转导的且未用 CCl_4 处理的大鼠(图 2A 和 2B; 图 3A)。相反地, 在未转导的和 rAAV/CAG-EGFP 转导的组中, 在施用 CCl_4 第 8 周后, 肝结构受到畸变。畸变的特征在于, 广泛的纤维变性替换(图 2C 和 2D; 图 3B 和 3C), 所有大鼠整个肝的实质的小结模式(图 3B 和 3C), 和肝细胞增殖的停止(图 4E)。实质细胞受到破坏, 形成了再生小结, 由纤维间隔分隔。网硬蛋白纤维放射状地遍布整个肝。观察到了连接中心区的薄纤维变性间隔的形成, 且在所有大鼠中, 实质的小结模式是明显的。评价所有大鼠肝中的纤维化, 揭示了在用 rAAV/CAG-大鼠 STAP 或 rAAV/CAG-人 STAP 颗粒转导、然后用 CCl_4 处理的大鼠中的 collapse I 的阳性区域的指数非常接近于未转导的且未用 CCl_4 处理的大鼠, 而未转导的、用 CCl_4 处理的大鼠或 rAAV/CAG-EGFP 转导的、用 CCl_4 处理的大鼠的 collapse 指数高 2 倍(图 3E)。转导 rAAV/CAG-STAP(人或大鼠), 抑制了在未转导的大鼠或 rAAV/CAG-EGFP 转导的大鼠的肝硬化中发现的 Glisson 氏鞘和 pseudosoluble 形成中的纤维状结缔组织组分。RT-PCR 分析来自用

PBS 处理、然后用 CCl_4 处理 8 周的大鼠的肝组织, 显示 procollase I (PC-1) 水平急剧升高(图 3F, 泳道 1 和 2), 而用 rAAV/CAG-人 STAP 或 rAAV/CAG-大鼠 STAP 颗粒转导、然后用 CCl_4 处理的大鼠的 PC-1 水平类似于未转导的且未用 CCl_4 处理的大鼠(图 3F, 分别是泳道 5 和 6; 泳道 7 和 8; 和泳道 3 和 4)。Procollase III (PC-3) 水平(图 3G) 和 TII 水平(图 3H)也表现出相同的趋势。

已经将 TGF- β 1 识别为在星状细胞中刺激产生纤维生成的主要因子, 它是人肝硬化的标志。连续 8 周 CCl_4 损伤后, 在未转导的大鼠中发现了 TGF- β 1 水平的提高(图 4A)。TGF- β 1 主要在小叶中心区表达, 且与增加的数目的 α -平滑肌抗原(α -SMA) (图 4C) 和结蛋白-阳性的细胞(未显示数据)相关, 二者都是活化的星状细胞的标志。rAAV/CAG-大鼠 STAP 的转导减少了 TGF- β 1 mRNA 基因表达(图 4H, 泳道 2)。在来自 rAAV/CAG-EGFP 转导的大鼠或未转导的大鼠的肝提取物中, TGF- β 1 水平更高(图 4H, 分别是泳道 4 和泳道 1)。而且, 结蛋白阳性的肝星状细胞在治疗组的硬化肝的纤维变性区域有所增加, 且其中的许多被转化成了肌成纤维细胞样细胞, 后者特异性地表达 α -SMA (图 4C 和 4G)。这些数据表明, TGF- β 1 能诱导肝星状细胞向增殖肌成纤维细胞样细胞的表型转变, 其能增强胞外基质组分的生产。已经将 TGF- β 1 视作上皮细胞和内皮细胞(包括肝细胞)的有效生长抑制剂。为了评价 STAP 在有丝分裂的肝细胞上的超表达, 还通过免疫组织化学染色评价了有丝分裂的肝细胞的存在。rAAV/CAG-大鼠 STAP-转导的组中的 PCNA 阳性的肝细胞的数目高得多(图 4F)。有丝分裂的数字、具双核的肝细胞和能表达 PCNA 的细胞的数目有相当大的增加。

为了确定转基因的 STAP 是否能预防由 CCl_4 处理造成的细胞凋亡性细胞死亡, 评价了转导 STAP 基因和 CCl_4 处理后的肝细胞的细胞凋亡状态。TUNEL 染色揭示, 在所有实验组的肝切片中, 都存在凋亡细胞。但是, 异位的 STAP 基因表达预防了 CCl_4 诱导的肝细胞的细胞凋亡(图 3I)。在用 rAAV/CAG-大鼠 STAP 或 rAAV/CAG-人 STAP 转导的大鼠的肝切片中的凋亡细胞的数目类似于未转导的且未用 CCl_4 处理的大鼠, 而在未转导的和 CCl_4 处理的大鼠的肝中的凋亡细胞的数目高了 2-4 倍(图 3J)。综合这些数据, 表明 STAP 的异位

基因表达足以预防肝硬化 (图 3D、3I、4B、4D 和 4F)。

测试了转基因 STAP 的表达对生理功能的作用,以确定它的作为治疗性基因恢复肝功能的潜力。生化分析表明, rAAV/CAG-大鼠 STAP (n=10) 和 rAAV/CAG-人 STAP (n=10)组中的 CCl₄ 引起的丙氨酸转氨酶(ALT) 和天冬氨酸转氨酶(AST)的血清水平类似,且非常接近于未转导的且未用 CCl₄ 处理的组(n=10),从而表明 CCl₄ 处理没有显著妨碍用 rAAV/CAG-STAP 处理的组中的肝功能。相反地,在用 rAAV/CAG-EGFP 转导的(n=10)或用 PBS 处理的(n=6)大鼠中,观察到了高血清水平的 ALT (图 5A) 和 AST (图 5B)。在用 CCl₄ 处理之前用 rAAV/CAG-STAP 颗粒(人或大鼠)转导大鼠,不仅能保护肝结构,而且能恢复肝功能。

异位的 STAP 基因表达逆转了恶化的肝纤维化

临界分析特征在于肝硬化的各种状况,使得可以评价在有或没有用 rAAV/CAG-STAP 转导的情况下,氧化应激对发病机理的贡献。为了测试 STAP 治疗肝硬化的潜力,用 CCl₄ 处理 40 只动物 8 周,然后用 rAAV/CAG-大鼠 STAP、rAAV/CAG-人 STAP、rAAV/CAG-EGFP 转导,或用 PBS 处理(n=10 只大鼠/组)。4 周后,处死所有的动物。组织化学揭示了与在预防实验中观察到的类似的趋势。生化分析还显示与在预防研究中观察到的类似的趋势(图 5C 和 5D)。

STAP 表达减少了星状细胞中的氧化应激

已经长期地将一种类型的肝细胞(肝星状细胞(HSC))的活化视作肝硬化的中心事件。预防 HSC 活化可以减缓甚至逆转肝硬化。为了确定是否可以用重组的 AAV 载体直接转导 HSC,从未转导的且未处理的肝中分离了星状细胞,并培养 3 天,用 rAAV/CAG-STAP 颗粒转导,然后培养 2 天。来自体外研究的免疫组织化学结果显示,超过 60% 的原代星状细胞可以被重组的 AAV 颗粒直接转导(图 5F)。用 rAAV/STAP 颗粒转导 2 天后,原代星状细胞的提取物的蛋白印迹进一步证实了该结论(未显示数据)。为了测试 STAP 是否能在肝硬化进展过程中作为抗纤维变性的过氧化物清除剂起作用,将原代星状细胞培养 7 天,然后等分试样进不同的孔中,并在 37℃ 培养箱中放置过夜。用 rAAV/CAG-大鼠 STAP、rAAV/CAG-人 STAP 或 rAAV/CAG-EGFP 颗粒转导(MOI 1: 1000)星状细胞(n=3 孔) 48 小时。用 Fe-NTA

和花生四烯酸诱导星状细胞的氧化应激 6 小时。在用 rAAV/CAG-大鼠 STAP 和 rAAV/CAG-人 STAP 转导的组中, 4-HNE 水平的下降明显高于 PBS 处理的或 rAAV/CAG-EGFP 转导的组(> 20%)(未显示数据)。这清楚地证实了, STAP 可以用作抗纤维变性的过氧化物清除剂起作用。STAP 蛋白可以异化过氧化氢和脂质氢过氧化物, 近来已经显示二者都会触发星状细胞活化。

STAP 诱导 AP-1 结合活性的变化

星状细胞对损伤的反应, 代表着具有独特的涉及基因表达的上调和下调的时间顺序的细胞程序。分析从正常的或损伤的肝中新鲜分离的细胞的基因表达, 能提供它们的体内行为的精确特征。对从未转导的大鼠或用 rAAV/CAG-STAP 颗粒转导的大鼠的肝中提取的总 RNA 进行 RT-PCR, 揭示了在未转导的、用 CCl₄ 处理的组中的显著增加的 Zf9 表达和生物合成(图 5G, 泳道 3 和 4)。在 rAAV/CAG-大鼠 STAP 转导的和 rAAV/CAG-人 STAP 转导的组中的 Zf9 水平非常类似于未转导的且未用 CCl₄ 处理的组(图 5G, 分别是泳道 7 和 8, 泳道 5 和 6; 和泳道 1 和 2)。为了探究 AP-1、rAAV/CAG-STAP 转导后的氧化应激的诱导和 c-jun 的 mRNA 水平变化之间的潜在的相关性, 测量了 c-jun 和 c-fos 水平(未显示数据)。然后, 确定了 c-fos 和 c-jun 的转录活化是否会导致功能性 AP-1 复合物的形成。为此, 使用电泳凝胶迁移率变动测定, 对比了从转导的和未转导的星状细胞分离出的核蛋白结合 AP-1 共有序列的能力。从 rAAV/CAG-STAP 转导的大鼠肝制备出的核提取物与含有 AP-1 结合位点的寡核苷酸探针的结合活性有了明显的降低(未显示数据)。

STAP 预防氧化应激引起的升高的 NF- κ B 的核水平

NF- κ B 结合的活化是对应激刺激高度反应性的。从活化的用或不用 STAP 载体转导 2 天、然后暴露于 ROS 中 18 小时的 HSC 制备出的核提取物的抗体凝胶迁移阻滞分析, 证实了 HSC 对氧化应激的反应代表着具有独特的涉及基因表达的上调和下调的时间顺序的细胞程序, 所述的基因表达包含氧化还原-敏感的转录因子 NF- κ B。另外, 用对 NF- κ B 的 p50 亚基特异性的抗体进行的抗体凝胶迁移阻滞分析, 揭示了该抗体会进一步阻碍结合复合物的迁移率, 从而表明 p65/p50 杂二聚体和可能的 p50 同二聚体在用 F-NTA 诱导后积累

在核中。但是,用 STAP 载体转导的 HSC 的结合活性甚至低于未处理的细胞中的水平。这些结果表明,STAP 在 HSC 中的超表达会阻碍由氧化应激引起的能结合基因组 kB 元件的蛋白的核转运。

D. 讨论

rAAV/CAG-大鼠 STAP 和 rAAV/CAG-人 STAP 颗粒对肝星状细胞的高体外转导效率表明,可以将这些重组的 AAV 载体视作治疗肝硬化的理想递送系统。以前的重组大鼠 STAP 的生化表征揭示,STAP 是一种新的内源过氧化物酶,其能表现出对过氧化氢和亚油酸氢过氧化物的过氧化物酶活性。

首先考虑了某些反应游离自由基或衍生的分子参与慢性病理学的证据。对由氧化应激对纤维生成组织变性的基因表达的可能干扰,给予了特别的注意。在明显限于非实质细胞的过程中(Poli 等, 1997),用助氧化剂 CCl_4 产生的慢性肝损伤,造成了增强的 $\text{TGF-}\beta$ 的转录和合成。氧化应激和 $\text{TGF-}\beta$ 表达和纤维生成作用之间的直接关联,来自 $\text{TGF-}\beta$ 的上调在所有情况下都平行于前胶原类型 I 的高表达的证据。增强的丙醛(MDA)和其它更毒性的羰基化合物例如 4-hydroxyalkenal 的生产,支持了脂质过氧化作用在 CCl_4 慢性肝损伤模型中的参与。胶原类型 I 共定位于对 MDA 和 HNE 蛋白加合物阳性的区域(Poli 等, 1997)。已经建立了 CCl_4 处理诱导的脂质过氧化作用、提高的前胶原 α -1 mRNA 水平和胶原在纤维变性肝中的沉积之间的关联(Lee 等 1995)。已经报道,通过合适地给大鼠肝补充维生素 E,可以预防 CCl_4 处理诱导的脂质过氧化作用(Poli 等, 1997)。在 3 倍增加生育酚(维生素 E)浓度的情况下, $\text{TGF-}\beta$ 1 表达在正常肝中的下调,证实了氧化还原反应也会参与该细胞因子的遗传调节。 $\text{TGF-}\beta$ 1 可能在组织修复和纤维发生的过程中起关键作用(Poli 等, 1997; Friedman, 2000)。该多效性的多肽对胞外基质具有许多作用,包括增加结缔组织的量的能力。用 CCl_4 处理、并用 rAAV/CAG-STAP 颗粒体外和体内转导星状细胞,抑制了 $\text{TGF-}\beta$ 1 (一种能刺激星状细胞纤维生成活性的主要因子),抑制了纤维发生和肝细胞的细胞凋亡,并提高了存活率。STAP 可以起肝中的抗纤维变性的过氧化物清除剂的作用,因为它能完全消除关键的纤维生成生长因子 $\text{TGF-}\beta$ 1 和胶原 I 的超表达。

已知细胞结构和功能的明显的氧化破坏会通过多种机理造成不可逆的损伤。在活化的星状细胞中,许多因子受到上调,并认为它们有助于纤维化以非常协调的方式发展。氧化应激对细胞因子基因表达的作用,好像是促进结缔组织沉积的重要机理(Poli 等,1997)。已经证实,反应性的氧种类会诱导至少 2 个转录因子家族的活化:激活蛋白-1(AP-1) 和核因子-kB (NF-kB)。AP-1 结合序列存在于许多真核生物基因中,且其通过与 jun-fos 核蛋白家族的同-和杂二聚体的相互作用而活化(Friedman, 2000; Whalen 等,1999)。已经显示,在细胞培养物和完整的大鼠中,由 CCl₄ 处理产生的氧化应激会引起 AP-1 转录因子的上调。转录因子 NF-kB 作为与抑制剂蛋白复合的无活性的杂二聚体存在于胞质中,其会屏蔽核定位信号和 DNA 结合部分。大多数(但不是全部)刺激引起的 NF-kB 的转运,包含氧化剂敏感的调节步骤(Poli 等,1997; Whalen 等,1999)。由于与未转导的且未用 CCl₄ 处理的大鼠或用 rAAV/CAG-STAP 颗粒转导的大鼠中的 NF-kB 水平相比升高的氧化应激,所以在 CCl₄-处理的大鼠的肝中,NF-kB 的核水平明显升高。这些结果证实,脂质过氧化作用在通过包含氧化还原-敏感的 NF-kB 转录因子的抗氧化剂敏感的途径活化 HSC 中起作用。另外,通过 STAP 表达,可以介导和/或逆转在用 CCl₄ 处理的大鼠中的 NF-kB 和 AP-1 的氧化依赖性的活化。

下述的基本观察支持了氧化剂种类调节基因表达的概念:(1) 氧化应激会在转录水平调节编码细胞因子的基因的表达(Mendelson 等,1996), (2) 脂质过氧化作用会上调纤维生成的细胞因子的表达和合成,和(3)脂质过氧化作用的醛式终产物会增强 HSC 的 I 型胶原合成(Parola 等,1998)。这些事件由转录因子的活化启动,从而导致胞外基质和基质金属蛋白酶-1和-2的组织抑制剂的 mRNA 表达(Bahr 等,1999。认为 rAAV/CAG-STAP 预防肝硬化的潜在机理是抑制了潜伏的与 TIMP(金属蛋白酶的抑制剂)复合的金属蛋白酶(MMP)。TIMP-1 (金属蛋白酶 1 的抑制剂)表达在活化的 HSC 中受到上调,并因此是 HSC 的潜在自分泌存活因子。TIMP-1 和 TIMP-2 mRNA 在肝中的表达模式密切反映了病理学的表现,从而表明这些基因确实起重要作用。这些 MMP 是基质蛋白酶解级联中的尿激酶型纤溶酶原(uPA)下游的效应物蛋白。已经显示,在 rAAV/CAG-STAP 转

导的动物的肝匀浆物中增强了 MMP-2 的表达。MMP2 能将胶原类型 IV 和其它胶原特异性地降解至更小的程度。但是, 需要确定与它的特异性抑制剂 TIMP-1 复合的有活性的 MMP-2 和 MMP-2 种类的量。

另外, 需要分析过氧化反应的程度, 所述的过氧化反应是由 HNE 在其中起部分作用的氧化应激的重要后果。通常, 在氧化应激过程中, 存在反应性的氧游离自由基(ROS) 和/或反应性的氮游离自由基(RNS)的过度生成。氧化反应的证据经常与肝硬化的发作有关。NF- κ B-结合位点位于 GM-CSF、TNF- β 1、IL-6 和与炎症有关的生长因子的启动子区。最主要的纤维生成细胞因子 TGF β -1 和 PDGF 的基因活化通过结合长末端重复序列上的 AP-1 位点而发生(Poli 等, 1997; Mari 和 Cederbaum, 2000)。

治疗人疾病的传统药理学方案已经导致了保健的显著进步。但是, 尽管取得了许多重大成功, 尚未开发出肝硬化的确定的治愈方案。STAP 对自由基-衍生的有机过氧化物的清除可以是适应性反应, 以标准化细胞活化过程中的细胞氧化还原状态。因而, STAP 在肝中起抗纤维变性的过氧化物清除剂的作用(Kawada 等, 2001)。基因治疗方案在人肝硬化中的潜在应用取决于治疗性基因向受广泛的纤维化影响的肝中的成功的和组织特异性的送递。因此, STAP 可能是理想的用于肝硬化预防和治疗的治疗性基因。另外, 已经报道向正常的大鼠肝中的 HGF 输注仅仅刺激外周区域的肝细胞增殖(Lee, 1997; Salgado 等, 2000)。在大鼠肝硬化模型中, 单次静脉内施用能编码非分泌形式的人 uPA 的复制缺陷的腺病毒载体, 会导致功能性 uPA 蛋白在肝中的高产。这导致胶原酶表达的诱导和伴随的肝细胞的纤维化的逆转和改善的肝功能。uPA 基因治疗可能是治疗人肝硬化的潜在有效策略(Salgado 等, 2000)。然而, 近数十年来逐渐清楚的是, 包含 uPA、纤溶酶原激活物抑制剂受体(uPAR)和纤溶酶原激活物抑制剂 PAI-1 和 PAI-2 的纤溶酶原激活系统在癌症的进攻性中起非常重要的作用。另外, 野生型 uPA 的出血倾向和腺病毒载体作为基因送递系统的应用会限制该方案的功效和安全性(Salgado 等, 2000)。重组的 STAP 的生化表征揭示, STAP 是一种新的内源过氧化物酶, 其能表现出对过氧化氢和亚油酸氢过氧化物的过氧化物酶活性, 从而表明

STAP 能起抗纤维变性的过氧化物清除剂的作用，以通过多种机理预防 HSC 的活化，且是肝硬化治疗的合适的治疗性基因。

总之，上述的研究证实了用 rAAV/CAG-STAP 颗粒转导大鼠会降低 TGF- β 1 和 α -SMA 的水平，并预防 CCl₄-诱导的肝硬化。STAP 的转导会抑制 TGF- β 、胶原 I 和 α -SMA 的表达。单剂 rAAV/CAG-STAP 会预防且可逆转肝硬化。可以将 rAAV/CAG-STAP 的进一步表征翻译成临床实验和用于治疗患有进行性肝硬化的患者的基因治疗的开发。

实验细节 II

A.方法

cDNA 克隆和重组 AAV 载体的产生：使用 Trizol (Life Tech.)，从 100 mg 肝组织提取了 RNA。使用 5.0 μ g 总 RNA，合成了第一链 cDNA，其由 Oligo DT (0.5 μ g, Promega)启动，然后使用 SuperScript II RNA 酶 H 逆转录酶(150U; Life Tech.)，在 42℃ 逆转录 90 分钟。使用没有 SuperScript II 的一式两份反应物作为阴性对照。循环参数是在 94℃ 5 分钟，随后是在 60℃ 1 分钟和在 72℃ 1 分钟的 40 个循环。扩增后，在 2% 琼脂糖凝胶(Life Tech)上电泳了 5 μ l PCR 产物，并用紫外光可视化。通过使用分别针对大鼠和人的一对引物 5'-ATG GAG AAA GTG CCG GGCGAC-3', 5'-CTA TGG CCC TGA AGA GGG CAG TGT-3'的 PCR，从 SD 大鼠肝组织克隆了 STAP cDNA。将大鼠 STAP cDNA 的可读框克隆进了 rAAV 构建体的 EcoR1 和 Not 1 位点，所述的 rAAV 构建体分别含有 AAV-2 ITR、CAG 启动子和旱獭乙型肝炎病毒转录后调节元件 (WPPE)，以促进表达。包装了能表达 STAP、GFP 和空颗粒的重组的 AAV 载体，并进行了肝素柱纯化。通过使用 Taqman 的实时 PCR (Perkin-Elmer Biosystem, CA)，定量了 rAAV 病毒基因组滴度。

星状细胞分离和培养

根据公开的工作，制备了肝星状细胞。简而言之，首先用不含 Ca²⁺/Mg²⁺的溶液灌注了肝，接着在 37℃ 消化 15 分钟。在 37℃，将软化的肝在含有 0.05% 胶原酶、0.02% 链霉蛋白酶 E 和 0.005% DNA 酶 I 的溶液中分散 15 分钟。通过离心(50g, 5 分钟)洗涤得到的悬浮液，

并通过离心(450g, 10 分钟, 20℃)沉淀非实质细胞。在 18% Nycodenz 垫(1400g, 20 分钟, 20℃)上, 通过离心得到了星状细胞富集级分, 并通过离心(450g, 10 分钟, 20℃)洗涤 2 次, 并且悬浮到补充了 10%胎牛血清(FBS)的 DMEM (GIBCO)中。如通过免疫细胞化学检测结蛋白所判断的, 细胞纯度总是大于 98%。在用 rAAV 载体 ($\text{MOI } 5 \times 10^4$) 转导 HSC 后 48 小时, 通过向培养基中分别加入 Fe-NTA 和花生四烯酸至 50 μM 和 20 μM 的终浓度, 诱导了脂质过氧化作用损伤。将这些实验组分别命名为 HSC-对照、HSC-rAAV/rSTAP、HSC-rAAV/hSTAP 和 HSC-rAAV/eGFP。在过氧化反应损伤后 0、6 和 18 小时, 通过 LPO-586 试剂盒(CalBiochem, 美国)确定了细胞裂解物和培养基中的脂质过氧化物, 包括 MDA 和 4-HNE (氧化应激的重要后果)。

蛋白印迹: 切开组织, 切碎, 并在蛋白裂解物缓冲液中匀浆。将蛋白样品(100 μg)溶解在 10% 聚丙烯酰胺 SDS 凝胶上, 并电泳地转移到硝酸纤维素 Hybond C extra 膜(Amersham Life Science, England)上。在用 5% BSA 封闭膜后, 用特异性的第一抗体温育印迹, 然后用辣根过氧化物酶-缀合的第二抗体温育, 并通过增强的化学发光(Amersham International plc, England)显色, 曝光于 X-射线胶片。

动物: 年轻的成年雄性 Sprague-Dawley 大鼠, 重约 120 克, 恒温圈养, 并无限制地供给实验室食物和水。在香港特别行政区政府的卫生部门和香港大学动物伦理委员会批准的研究方案下, 进行所有的研究。对于保护研究, 除了正常的动物组外, 给所有的无病原体的雄性 SD 大鼠每周 2 次门脉内 (i.p.) 地施用 0.5ml/kg CCl_4 , 其与橄榄油混合成 50% (体积/体积)的终浓度, 持续 8 周。将动物分成 5 组 ($n=10$): 组 1, 正常的对照, 正常的仅用 PBS 处理的大鼠(也是门脉内 (intraportal) 注射); 组 2, CCl_4 -对照, 在用 CCl_4 诱导 8 个连续周之前门静脉内 PBS 注射 2 周的大鼠(慢性 CCl_4 动物模型); 组 3、4 & 5, CCl_4 -AAV/eGFP、 CCl_4 -AAV/rSTAP、 CCl_4 -AAV/hSTAP-在 CCl_4 诱导之前, 分别用每只动物 3×10^{11} rAAV/eGFP、rAAV/rSTAP & rAAV/hSTAP 的 rAAV 颗粒转导 2 周的大鼠。对于这些用于治疗研究的动物, 用 CCl_4 每周 2 次地诱导了 40 只动物, 连续 8 周, 然后分别注射病毒载体。在分析之前, 将样品保藏在 -80°C 。通过门静脉递送所有的病毒载体。

电泳凝胶迁移率变动测定(EMSA): 使用 EMSA 来评价能结合 AP-1 和 NF- κ B 的特定共有 DNA 序列的转录因子的丰度。通过 T4 多核苷酸激酶(Boehringer-Mannheim), 用 50 μ Ci [32 P] ATP (4000 Ci/mmol, ICN Costa Mesa, CA, 美国)标记了 20 ng 每种 AP-1 蛋白复合物 (5'-AGC ATG AGT CAG ACA CCT CTT GGC-3') 和 NF- κ B 蛋白复合物 (5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3') 共有寡核苷酸(Santa Cruz)。对于竞争研究, 将 50 倍过量的未标记的 AP-1 或 NF- κ B 和 CEBP 5'-TGC AGA TTG CGC AAT CTG CA-3'包含在反应混合物中。与标记的探针温育核蛋白后, 将反应混合物在非变性聚丙烯酰胺凝胶上分离, 并干燥凝胶, 以进行放射自显影和光密度扫描。

TUNEL 染色: 使用如原位细胞死亡检测试剂盒(Roche Molecular Biochemicals)所述的下述方法, 测试了细胞对 rAAV-EGFP 或 rAAV/CAG-STAP 的敏感性。从已经在 4% 低聚甲醛中固定、并包埋在石蜡中的肝组织, 制备了 8 μ m 厚的系列切片。

用于确定 STAP 诱导的基因表达的 RT-PCR 分析: 使用 RNeasy B, 从冷冻组织分离了总 RNA。使用 GeneAmp RNA PCR Core 试剂盒(PerkinElmer Life Science), 通过逆转录-聚合酶链反应, 确定了每个样品中的信使 RNA 表达: TIMP-1: 5'-CCA CAG ATA TCC GGT TCG CCT ACA- 3' (正向), 5'-GCA CAC CCC ACA GCC AGC ACT AT-3' (反向)。循环参数是在 94 $^{\circ}$ C 5 分钟, 随后是在 94 $^{\circ}$ C 1 分钟、在 55 $^{\circ}$ C 1 分钟和在 72 $^{\circ}$ C 1 分钟的 35 个循环。扩增后, 在含有溴化乙锭的 1% 琼脂糖凝胶上电泳了 PCR 产物, 并用紫外光可视化。用于该研究的其它引物是: 前胶原 α 类型-1: 5'-TAC TAC CGG GCC GAT GAT GC-3' (正向), 5'-TCC TTG GGG TTC GGG CTG ATG TA-3' (反向), 前胶原 III: 5'-CCC CTG GTC CCT GCT GTG G-3' (正向), 5'-GAG GCC CGG CTG GAA AGA A- 3' (反向), TGF- β 1: 5'-TAT AGC AAC AAT TCC TGG CG-3' (正向) 和 5'-TGC TGT CAC AGG AGC AGT G-3' (反向), WPRE: 5'-GCT AAA GAT TCT TGT ATA AAT CCT GGT TGC TGT CT-3' (正向), 5'-GCA TCT CGA GGA AGG GAC GTA GCA GAA GAA C-3' (反向)。而 G3PDH 是使用的内部对照, G3PDH: 5'-CCC TTC ATT GAC CTC AAC TAC ATG G-3'

(正向), 5'-CAT GGT GGT GAA GAC GCC AG-3' (反向)。 *c-myc* : 5'-CAA ACT GGT CTC CGA GGA GC-3' (正向), 5'-ACA TGG CAC CTC TTG AGG AC-3' (反向); GST- α 1: 5'-TCT GAA AAC TCG GGA TGA CC-3' (正向); 5'-CTG CGG ATT CCC TAC ACA TT-3' (反向); GST- α 2: 5'-AGA TTG ACG GGA TGA AGC TG- 3' (反向), 5'-GTG CAG CTC CGC TAA AAC TT-3' (反向)。

原位杂交: 如前所述, 进行了原位杂交。根据建立的原位杂交方案(Ambion), 将脱水的切片在 55℃与探针溶液杂交过夜。用 1x BCIP/NBT 溶液(Zymed)展开切片至需要的密度。使阴性对照与 Dig-标记的有义 cRNA 杂交。

免疫组织化学染色和分析: 将肝浸泡在溶于 PBS 中的 30% 蔗糖中, 在恒冷切片机上切成 10 μ m 厚的切片, 并解冻封固到载玻片。用含有 0.2% Triton-X100 的 PBS 冲洗切片 3 次, 然后在溶于甲醇中的 1% H₂O₂ 中温育 1 分钟, 在 PBS 中冲洗 3 次, 然后用在溶于 PBS 中的 4% 马血清中温育 1 小时。再次用 PBS-Tween 20 冲洗后, 将切片与第一抗体在室温温育过夜。在用第二抗体温育 2 小时之前, 用 PBS-Tween 洗涤切片 5 分钟。然后, 用 PBS 或蒸馏水冲洗切片, 再用 Vectashield (Vector La, California)封固。使用 Leica 4d TCS 共焦显微镜, 捕获免疫荧光信号, 并使用 Adobe Photoshop5.0 处理图像。通过免疫组织化学, 检查了 TGF- β 1、 α -平滑肌肌动蛋白和前胶原类型 1 的合成。

生化分析:在 Queen Mary Hospital, Hong Kong 中, 测定了大鼠血液中的血清清蛋白、胆红素、天冬氨酸转氨酶(AST) (EC2.6.1.) 和丙氨酸转氨酶(ALT) (EC 2.6.1.2)活性。

Masson 氏三色和 HE 染色: 用 Masson 氏三色和苏木素-曙红对石蜡包埋的切片进行染色。使用计算机图像分析技术, 在 Masson 氏三色-染色的组织载玻片上, 检测了肝硬化, 其中集中在实验组中的病理学变化的程度, 包括坍缩肝细胞的比例、再生小结、纤维间隔的分布、网硬蛋白纤维的扩散、薄纤维变性间隔的形成和实质的小结模式。分析了处理的和未处理的纤维变性组织区域之间的差异。

统计学分析:将数据表示为平均值 \pm SEM, 通过 ANOVA 检验显著性。当小于 0.05 时, 认为 *P* 值是统计学上显著的。

羟脯氨酸含量的确定：通过浓盐酸，进行了水解。酸水解后，通过带有荧光检测的反相 HPLC，测量了羟脯氨酸的水平。

胆总管结扎的实验模型：给雄性 Sprague-Dawley 大鼠(200 ± 20 g) 分别注射了 5×10^{11} rAAV-EGFP 或 rAAV/rSTAP/动物($n=6$)。在第 3 天，双结扎胆总管，并在麻醉下切开。用相同的方法处理了假处理的大鼠，只是没有结扎胆管和切开($n=6$)。通过标准方案，取出血液样品，以确定 AST 和胆红素。在对大鼠结扎 28 天后，处死大鼠。如上所述，通过标准方法，从 SD 大鼠分离了 HSC 和非-HSC 的细胞，用于进一步分析。将肝片固定在 4%福尔马林中，用于组织学检查。对于处理研究，在分别注射 5×10^{11} rAAV-EGFP 或 rAAV/rSTAP/动物($n=5$)之前，将雄性 SD 大鼠的胆总管双结扎 12 天。注射后 12 天，处死动物。

B. 结果

STAP 的超表达会抑制 HSC 的体外活化

已经长期地将 HSC 的活化视作肝硬化的中心事件。预防 HSC 活化可以减缓甚至逆转肝硬化。成功地靶向 HSC 是抗纤维变性治疗的关键步骤。为了确定是否可以用 rAAV 有效地转导 HSC，用含有 570bp 大鼠或人 STAP (rAAV/rSTAP, rSTAP) 或 (rAAV/hSTAP, hSTAP) 的 rAAV 转导了新鲜分离的原代大鼠肝 HSC 细胞(培养 3 天)。免疫组织化学染色证实，转导了培养物中的约 90% 原代 HSC (结蛋白染色表明，98 % 细胞是 HSC-)。蛋白印迹证实了 STAP 在转导的细胞中超表达。慢性氧化应激和损伤与随后的肝纤维化和肝硬化的诱导有关。接着，测试了异位表达的 STAP 是否能在 HSC 的活化的过程中，起有效的抗氧化剂的作用，从而改善肝硬化。用 rAAV/rSTAP、rAAV/hSTAP 或对照 rAAV/eGFP 载体(MOI: 5×10^4) 转导了原代 HSC，且 48 小时后，通过暴露于 $50 \mu\text{M}$ Fe-NTA 和 $20 \mu\text{M}$ 花生四烯酸 (Fe/AA 处理) 中 18 小时，进行氧化应激处理。在未转导的 HSC 或感染了对照载体(rAAV/eGFP)的那些中，Fe/AA 处理造成了丙醛 (MDA, 47.0 ± 15.4 至 94.4 ± 34.0 nmol/克蛋白) 和 4-羟基壬烯醛(4-HNE, 21.8 ± 5.3 至 34.7 ± 5.3 nmol/克蛋白, $P < 0.01$, ANOVA) 的水平显著提高($P < 0.01$, ANOVA)。相反地，在 STAP 转导的细胞的培养基中，MDA 和 4-HNE 的水平没有统计学上显著的变化。实际上，即

使在没有 Fe/AA 处理时, STAP 转导的细胞也产生了比对照未转导的 HSC 明显更低水平的 MDA 和 4-HNE。

Fe/AA 处理的原代 HSC 的一个最突出的特征是它们的增强的 TIMP-1 和 TGF- β 1 的合成(在活化的 HSC 中产生的促纤维生成因子)。通过 RT-PCR, 测定了 TIMP-1 和 TGF- β 1 mRNA 的水平。在暴露于 Fe/AA 的 HSC 中, 出现了高 mRNA 水平, 而在 STAP 转导的 HSC 中, 抑制了 TIMP-1 和 TGF- β 1 mRNA 水平。在没有 Fe/AA 处理时, 后者具有比培养了 14 天的对照原代 HSC 更低水平的这些因子。这些研究证实了, STAP 超表达能在 HSC 的体外 Fe/AA 处理过程中, 起有效的抗氧化剂的作用。

STAP 体外诱导了 AP-1 结合活性的变化

为了探究在 rAAV/STAP 转导后, AP-1 和氧化应激的诱导之间的潜在关联和 STAP 的潜在功能, 使用电泳凝胶迁移率变动测定对比了从转导的、未转导的和对照 HSC 分离的核蛋白与 AP-1 共有序列的结合的程度。在 Fe/AA 处理后, 原代 HSC 细胞中的 AP-1 结合活性显著增加。另外, 在暴露于 Fe/AA 之前, 用 rAAV/rSTAP 转导了 2 天的 HSC 中的结合活性甚至低于正常的。为了确定该结合活性的差异是否也与 c-jun 蛋白水平的变化有关, 通过蛋白印迹检查了在暴露于 Fe/AA 之前, 正常的 HSC 和用或不用 rAAV/rSTAP 转导 2 天的 HSC 的核提取物。使用抗-jun 的免疫印迹揭示了在 Fe/AA 处理的 HSC 中的更高的 c-jun 水平, 而 STAP 转导的细胞具有更低的 c-jun 水平。

STAP 会预防氧化应激诱导的核 NF-kB 中的增加

如抗体凝胶迁移阻滞分析从对照 HSC 或用 STAP 转导 2 天、然后暴露于 Fe/AA 处理(50 μ M Fe-NTA 和 20 μ M 花生四烯酸处理 18 小时)的 HSC 制备出的核提取物所证实的, NF-kB 结合的活化是对应激刺激高度反应性的。在 Fe/AA 处理的 HSC 中, 可以检测到增强水平的核 NF-kB、氧化还原-敏感的转录因子。该增强会受到诱导氧化应激之前的 STAP 的超表达的抑制。另外, 使用对 NF-kB 的 P65 亚基特异性的抗体的抗体凝胶迁移阻滞分析揭示, 这些结合复合物的迁移率也受到延迟, 从而表明在 Fe/AA 处理后, p65/p50 杂二聚体和可能的 p65 同二聚体会积累在核中, 从而表明通过 STAP 在 HSC 中的超表达, 可以阻遏氧化应激介导的能结合 NF-kB 反应元件的蛋白的

核水平的增加。

用 rAAV/STAP 体内转导肝

为了评价在肝内增强 STAP 的表达的体内作用，将 3×10^{11} 载体颗粒送递进每只雄性 SD 大鼠的门静脉。4 周后处死动物，并进行原位杂交研究来检测 STAP 转录物，但是主要是在从 rAAV/STAP 感染的动物得到的肝样品的外周区域。肝组织的免疫组织化学染色证实了 STAP 蛋白在 rAAV/rSTAP 感染的大鼠肝中的增强的表达。如同 STAP 转录的情况一样，蛋白表达主要限制在转导的肝的外周区域。用结蛋白对组织切片进行的双重染色进一步强调，rAAV-2 优先转导 HSC，而不是肝细胞。

在慢性 CCl_4 处理的动物的肝切片中发现了最强的 STAP 免疫反应性，其中 HSC 和损伤的肝细胞都被阳性染色。虽然 STAP 与血红蛋白和肌红蛋白家族的蛋白具有约 40% 氨基酸序列同源性，但使用的抗体能识别出 STAP 的 N-末端 21 个氨基酸，其与血红蛋白/肌红蛋白家族成员没有同源性。蛋白免疫印迹分析暴露于慢性 CCl_4 诱导的损伤的正常动物中的 STAP，证实了存在高水平的二聚体形式的 STAP。相反地，在 rAAV/STAP 肝中，STAP 主要是单体的形式。该单体形式的 STAP 的存在和/或以前转导的 HSC 对它的连续的和升高的表达，可能负责它保护免受 CCl_4 诱导的肝硬化的能力。

STAP 基因表达能预防 CCl_4 诱导的肝硬化

为了检查 STAP 体内抑制损伤诱导的肝纤维化、从而预防动物中的恶化的纤维化的潜力，如所述的，将 rAAV/rSTAP、rAAV/hSTAP、rAAV/eGFP 或等体积的载体 PBS 送递给雄性 SD 大鼠(每组 $n=10$)。

组织学检查证实了 CCl_4 -rAAV/rSTAP & CCl_4 -rAAV/hSTAP 大鼠和正常的未处理的动物的肝组织的类似的结构(图 3a)。相反地，在 CCl_4 -对照 & CCl_4 -rAAV/eGFP 大鼠中，肝结构发生畸变。畸变的标志是广泛的纤维变性替换(图 3b, c)，其具有遍布肝实质的小结模式。实质细胞也具有“坍缩的”外观，且存在被纤维间隔和放射状网硬蛋白纤维隔开的再生小结。观察到了连接中心区的薄纤维变性间隔的形成，且小结模式在肝实质中是明显的。使用计算机辅助成像，通过对胶原-I 阳性区域的比例进行定量，确定了纤维化指数。虽然 CCl_4 -rAAV/rSTAP 和 CCl_4 -rAAV/hSTAP 大鼠中的纤维化指数比对照动物

中的指数高约 2 倍,但这些值小于 CCl_4 -rAAV/eGFP 的指数的一半,且小于用 CCl_4 处理的未感染的动物的值的 1/3(图 3e)。STAP 载体转导会抑制在未处理的动物的肝硬化中发现的 Glisson 氏鞘和假小叶 (pseudolobular) 形成中的纤维状结缔组织组分。另外,RT-PCR 分析从这些动物分离出的肝组织,揭示了在 CCl_4 -对照 & CCl_4 -AAV/eGFP 大鼠中急剧升高的前胶原-I 水平。这与在 CCl_4 -rAAV/rSTAP、 CCl_4 -rAAV/hSTAP 和正常的大鼠中的类似的低水平的前胶原-I 相反。与纤维化的组织学证据相一致,在 CCl_4 -对照和 CCl_4 -AAV/eGFP 大鼠中,存在高水平的 TGF- β 1(在活化的 HSC 中产生的主要的促纤维生成因子)转录物和蛋白。通过主要在小叶中心的 TGF- β 1 染色,其与使用 α -平滑肌肌动蛋白和结蛋白(二者都是活化的 HSC 的标记)对这些细胞的阳性染色相对应,进一步证实了活化的 HSC 有助于增强的 TGF- β 1 生产。在 CCl_4 -rAAV/rSTAP & CCl_4 -rAAV/hSTAP 大鼠中,rAAV/STAP 转导显著地减少了 CCl_4 -诱导的 TGF- β 1 mRNA 和蛋白表达的增加。另外,在 CCl_4 -对照和 CCl_4 -AAV/eGFP 的肝中,在纤维变性区域可以检测到增加数目的结蛋白阳性的 HSC,其中的许多被转化成了 α -SMA 阳性的肌成纤维细胞样细胞。氧化应激诱导的 TGF- β 1 在 HSC 中的表达的其它证据是,这些细胞中的 TGF- β 1 的上调和前胶原-I 和 SMA 的增强的表达。

接着,确定了转基因 STAP 的表达是否能预防 TGF- β 1 诱导的肝细胞中的细胞凋亡,后者是另一种较好记载的氧化应激的下游致病特征。TUNEL 染色揭示,凋亡细胞存在于所有实验组的肝切片中。但是,STAP 基因表达明显预防了 CCl_4 诱导的肝细胞的细胞凋亡,因为 CCl_4 -rAAV/rSTAP & CCl_4 -rAAV/hSTAP 大鼠的肝切片中的凋亡细胞的数目类似于正常肝中的水平,而 CCl_4 处理的和 AAV/eGFP 动物具有高 2 倍的细胞凋亡水平。因此,通过门静脉送递 rAAV/STAP,STAP 的转基因表达能预防 CCl_4 诱导的肝硬化。

为了进一步证实转基因 STAP 的表达的保护作用,检测了血清天冬氨酸转氨酶(AST)和丙氨酸转氨酶(ALT)水平。在正常的动物和 CCl_4 处理的 rAAV/rSTAP 和 rAAV/hSTAP 动物的血清中,存在类似的 AST 和 ALT 水平,暗示着用 rAAV/STAP 处理的动物的正常的肝功能,且没有显著的肝坏死损伤,后者由 CCl_4 处理正常的动物所诱

导。接近正常水平的 α -SMA 蛋白和 TIMP-1 mRNA 在 CCl₄ 处理的 rAAV/STAP 动物中的存在,进一步支持了 STAP 对 HSC 活化的抑制。

为了阐明 AP-1 DNA 结合活性的体内调节是否参与 STAP 赋予的保护,我们分析了从这些动物实验组分离的肝组织的核提取物。STAP 的转基因表达明显与降低的核蛋白与 AP-1 共有序列寡核苷酸探针的结合相关联。类似地,如通过 RT-PCR 所测得的, *c-myc* mRNA 增加的诱导,会受到处理组中的转基因 STAP 表达的抑制。如下述事实所强调的,这些变化不太可能是非特异性的:在任何一个实验组中都没有 GST- α 1 mRNA 变化,但是在 CCl₄-对照和 CCl₄-AAV/eGFP 大鼠中,存在 GST- α 2 mRNA 水平的降低,而在 CCl₄-rAAV/rSTAP 和 CCl₄-rAAV/hSTAP 大鼠中没有。由于 GST 赋予了休眠的 HSC 中的内源过氧化物酶活性,所以该数据证实了转基因的 STAP 起有效的抗纤维变性的过氧化物清除剂的作用的能力,能抑制 HSC 的活化。

STAP 超表达能改善以前暴露于 CCl₄ 中造成的进行性肝损伤

从基于临床和实验室研究数据得到的累积数据支持肝硬化的早期阶段可以是可逆的。为了探究异位的 STAP 表达是否能在我们的范例中逆转肝硬化,在结束 8-周 CCl₄ 注射的过程后,分别给 CCl₄-大鼠门静脉内地注射 3×10^{11} rAAV/rSTAP、rAAV/hSTAP 或 rAAV/eGFP (n=10)。然后,在连续施用 CCl₄ 另外 4 周后,处死这些动物,进行分析。组织学和免疫化学检查揭示了实验大鼠与在预防研究中所发现的类似的趋势。尽管有连续的 CCl₄ 诱导,但当与 CCl₄-对照或在第 8 周和在第 12 周的 rAAV/eGFP 相比较时,STAP 的施用导致了明显的愈合过程,其涉及坏死的/细胞凋亡的细胞碎片的清除和胞外基质的重建。相反地, rAAV/eGFP 大鼠揭示了肝组织学的进行性变化,且在 TGF- β 1 和 α -SMA 阳性的细胞中进一步增强,它们广泛分布,且形成几个放射网络。由于 TGF- β 1 的超表达是各种器官中的组织纤维化的主要原因。实质细胞的坍塌和再生小结的形成继续发生,且网硬蛋白纤维的增厚也是明显的。但是,在 rAAV/rSTAP 和 rAAV/hSTAP 大鼠中,异位的 STAP 表达显著地逆转了这些特征,其中在门静脉周的 (periportal) 和小叶中心的肝中存在最少的残余纤维化,且没有明显的肝结构变形。

rAAV 驱动的 STAP 基因治疗也导致了肝功能的改善。

生化分析揭示, 在 CCl_4 处理的 rAAV/eGFP 动物中, 血清 ALT 水平从第 8 周的 $1,603 \pm 397 \text{ U/L}$ 连续增加到第 12 周的 $2,080 \pm 110 \text{ U/L}$, 且比正常高约 30 倍。对于 rAAV/hSTAP 大鼠, 则急剧降低至 $67 \pm 15 \text{ U/L}$, 对于 rAAV/rSTAP 大鼠, 则急剧降低至 $99 \pm 18 \text{ U/L}$, 且接近正常值或在正常范围内。类似地, rAAV/eGFP 中的血清 AST 水平连续增加, 且比正常值高约 17 倍, 而 rAAV/rSTAP 和 rAAV/hSTAP 大鼠中的 AST 水平从第 8 周的 $1,280 \pm 265 \text{ U/L}$ (CCl_4 -对照)降低至第 12 周的 $179 \pm 37 \text{ U/L}$ (对于 rAAV/rSTAP) 和 $198 \pm 25 \text{ U/L}$ (对于 rAAV/hSTAP), 且比正常值高约 2 倍。在 rAAV/rSTAP 和 rAAV/hSTAP 中, 这些重要的变化伴有纤维化的减少和向正常肝结构的恢复。在 rAAV/eGFP 组中, 没有观察到这样的变化。因此, 数据显示了通过 STAP 的施用可以改善肝纤维化的前途。

STAP 超表达会改善总胆管结扎造成的进行性肝损伤

为了探究异位 STAP 表达是否可以减少在其它动物模型中的发展的肝纤维化。给雄性 Sprague-Dawley 大鼠 ($200 \pm 20 \text{ g}$) 分别注射了 5×10^{11} rAAV-EGFP (BDL-eGFP) 或 rAAV/rSTAP (BDL-STAP) /动物 ($n=7$)。在第 3 天, 双结扎胆总管, 并在麻醉下切开。用相同的方法处理了假处理的大鼠, 只是没有结扎胆管 ($n=7$)。在 BDL 后 28 天, 用 rAAV/Egfp 预处理的大鼠 ($n=7$) 具有明显的胆汁郁积的肝损伤, 这被具有小结发展的广泛纤维化的组织学证据所证实 (图 12b)。在该组中的大鼠逐渐发展成腹水, 且有 2 只 在第 21 和 27 天死亡。但是, 在 BDL 之前接受 rAAV/rSTAP 的所有大鼠 ($n=7$) 都仍然存活, 且没有腹水, 尽管肝组织学表现出胆管增殖和同心性导管周纤维化, 基本上保持了肝结构 (图 12D)。在诱导胆汁郁积的肝损伤之前, STAP 在 HSC 中的超表达能降低肝功能障碍的程度, 如由总胆红素 (假的: $2.1 \pm 0.8 \mu\text{mol/L}$; rAAV/rSTAP: $51.6 \pm 30.1 \mu\text{mol}$; 和 rAAV/eGFP: $99.9 \pm 24.2 \mu\text{mol}$) 和 AST (假的: $74.3 \pm 28.9 \text{ U/L}$; rAAV/rSTAP: $407 \pm 209 \text{ U/L}$; rAAV/eGFP: $807 \pm 357 \text{ U/L}$) 所评价的。羟脯氨酸含量是 $0.09 \pm 0.03 \text{ mg/g}$ (假的), $0.42 \pm 0.26 \text{ mg/g}$ (BDL-STAP) 和 $0.87 \pm 0.43 \text{ mg/g}$ 肝组织 (BDL-eGFP)。

当在 pv 注射 rAAV/eGFP ($n=5$) 或 rAAV/rSTAP ($n=5$) 之前 12 天进行 BDL 时, 观察到了类似的治疗效果。在处死时起另外 12 天后, 在

接受 rAAV/rSTAP(图 14D)的那些中, 肝组织学表现出明显比接受 rAAV/eGFP (图 13B)的更少的纤维化。胆汁郁积的肝损伤发作后, STAP 基因治疗减少了肝机能障碍的程度, 如由总胆红素(假的 $2.9 \pm 1.0 \mu\text{mol/L}$, 与 rAAV/rSTAP $77.3 \pm 35.0 \mu\text{mol}$ 相比, $P < 0.05$; 和 rAAV/eGFP $130 \pm 11.3 \mu\text{mol}$, $P < 0.05$) 和 AST (假的 $74.3 \pm 28.9 \text{ U/L}$, 与 rAAV/rSTAP $497 \pm 253 \text{ U/L}$ 相比, $P = 0.0668$; 和 rAAV/eGFP $1,113 \pm 112 \text{ U/L}$, 与假的相比, $P < 0.01$, 和与 rAAV/STAP 相比, $P = 0.065$) 所评价的, 并在处死时从肝中分离的 HSC 中, 诱导了休眠表型, 如通过实时 RT-PCR 分析 TGF- $\beta 1$ 和 PC-1 转录物的水平所估计的(图 14A-14D)。

STAP 表达的长期作用 and 安全性

为了估计 STAP 在人肝纤维化治疗中的应用潜力, 我们建立了一组新的实验来监控长期作用和安全性。结束 8-周 CCl_4 注射阶段后, 给 CCl_4 -大鼠分别门静脉内地注射 3×10^{11} rAAV/rSTAP 和 rAAV/eGFP ($n=5$)。对动物进行另外 4 周连续的 CCl_4 诱导, 然后在正常条件下饲养 40 周, 再处死。一组正常的用作对照。我们发现, 如以前关于 CCl_4 诱导的动物所报道的, 所有检查的动物在总体外观和行为上都是正常的。除了其中 2 只大鼠在实验阶段死亡的 CCl_4 -eGFP 以外, 所有动物都较好地存活。在 CCl_4 -rSTAP 组中, 没有发现肿瘤或异常的外观。在 3 个实验组中没有显著的体重差异, 但是在 CCl_4 -eGFP 和 CCl_4 -STAP 组的腹腔中, 有实质的脂肪积累, 但在正常组中没有。以前的研究人员指出, CCl_4 诱导的副作用会导致在诱导的动物中的脂肪积累的增加。为了确定 CCl_4 诱导和 STAP 表达对肝结构的实际效果, 对不同组的肝组织切片进行了组织学和免疫染色分析, rAAV/STAP 的施用显著减少了肝损伤和纤维化。在 rAAV/STAP 组中, 仍然有纤维化的迹象, 但是在 rAAV-STAP 组的所有切片中都不能发现积累的胶原网络(图 15E-15F)。另外, 肝的组织学切片揭示, 所有 rAAV-STAP 都已经愈合, 尽管在结束时不能清楚地完全消除纤维化。相反地, 在 CCl_4 -eGFP 的所有切片中仍然可以发现的积累的胶原网络具有特征性外观, 即是膨大的、硬的和小结的, 这是由于在用 CCl_4 不连续地处理 40 周后广泛分布的肝纤维化(图 15A-15B)。羟脯氨酸含量是 $0.268 \pm 0.05 \text{ mg/g}$ 肝组织 (正常组), $0.309 \pm 0.051 \text{ mg/g}$

肝组织 (rAAV/STAP 组) 和 0.387 ± 0.06 mg/g 肝组织 (CCl₄-eGFP)。综合所有的数据, TSAP 是肝纤维化治疗的非常有前途的试剂。

C. 讨论

转化的(活化的)窦状 HSC 是肝纤维化中的胞外基质的病理性沉积的引发源, 所述的肝纤维化由病毒感染、代谢应激、胆道阻塞和遗传缺陷的损伤触发。实验的和临床的数据已经暗示, 肝纤维化和早期肝硬化可以是可逆的, 由此鼓舞了特异性地靶向 HSC 的治疗策略的开发。已经进行了尝试, 来阻断休眠的 HSC 的活化, 诱导活化的 HSC 或肌成纤维细胞的细胞凋亡, 和通过将它们偶联到结合在这些细胞上调的细胞表面胶原 VI 受体上的环状肽上, 将试剂送递给活化的 HSC。

为了证实负责启动和维持进行性肝纤维化的候选细胞内分子途径的治疗作用, 在体内选择性地靶向不同的主要细胞类型的能力是至关重要的。已经显示, rAAV-2 能高效率地体外转导 HSC, 从而使其成为有吸引力的用于 HSC 靶向的载体。以前的研究已经显示, 腺病毒对从正常肝分离出的 HSC 的转导效率小于 60%。用相同的构建体和 MOI 的含有报道基因 eGFP 的 rAAV-1、rAAV-2 和 rAAV-8 对原代肝细胞的转导, 揭示了 rAAV-2 是用于转导 HSC 的最有效的试剂。所有这些数据和最近报道的 rAAV-2 对肝细胞仅仅至多 5% 的体内转导效率和 rAAV-2 对门静脉周组织的优先转导, 暗示着 rAAV-2 可以在体内有效地靶向 HSC。

尚未开发出确定的肝硬化治愈方法。已经研究了使用 uPA、HGF 和端粒酶治疗人患者中的肝硬化的可能性, 但是已经提出了关于该方案是否能安全地使用的疑问。靶向 HSC 提供了一个诱惑人的替代方案。通过体内建立的 HSC 的有效选择性的转导, 我们能够检查重要的肝特异性的抗氧化剂分子 STAP 的作用。

最初通过硫代乙酰胺诱导的纤维化肝的对比性的蛋白质组学研究分离了 STAP。通过免疫印迹和免疫细胞化学分析, 发现了类似的 STAP 四氯化碳诱导的肝纤维化的诱导。与 rAAV 驱动的 STAP 在 HSC 中的增强表达非常不同, 内源的 STAP 上调不能赋予抗-纤维化保护。一种可能的解释是, CCl₄ 诱导的主要的内源二聚体形式的 STAP 是无活性的, 或者如单体 STAP 一样在生物学上更无效, 如在

rAAV/STAP 驱动的体内超表达中主要的单体形式和单体 hSTAP 的过氧化物酶活性和它以剂量依赖性的方式抑制缀合的二烯形成的能力所暗示的。

肝是高度代谢的，且负责代谢药物/异生素，从而使它自身处于来自形成 ROS 所引起的氧化应激的高危险中。近来描述的一种机理将氧化应激与 HSC 中的核信号传导、以及肝纤维化的发病机理相关联。与 STAP 的超表达能稳定暴露于 ROS 的 HSC 中的 HNE 和 MDA 的水平相一致，我们认为 STAP 能通过清除破坏性的游离自由基，保护免受由 HNE、MDA 或其它 ROS 造成的细胞损伤。

GST 是 HSC 中的内源性抗氧化系统的关键组分，其能将脂质过氧化作用的产物（例如 HNE）迅速地转化成谷胱甘肽缀合物，这对于高度代谢的肝而言是关键的基本功能。HSC 的活化或转化会有助于扩大来自原发损伤的其它应激的影响。有理由认为，GSTa2 在 STAP 超表达的 CCl₄-诱导的慢性模型中的正常化，指示着 CCl₄-诱导的慢性动物缺少 GST 的主要形式，因此具有有限的解毒 ROS 的能力。因而，HNE 和 MDA 等化合物会积累，并由此影响其它的至关重要的细胞功能，从而导致增加的胞外基质沉积。STAP 向 CCl₄-诱导的慢性动物内的转导，使 HSC 的 GST mRNA 水平能够正常化。可以预防 GST 的丧失，活化的 HSC 对氧化应激更有抗性，因此在用 rAAV/STAP 或 rAAV/hSTAP 载体处理的动物中的胶原 I 阳性的区域的指数非常接近正常大鼠。另外，可以将 HSC 的活化与长期的和持续的包含在调节 GST mRNA 表达中的转录调节和/或转录后的事件相关联。STAP 因而可以在肝中起抗纤维变性的过氧化物清除剂的作用。

与其它的转录因子一样，NF- κ B 对位于 p50 亚基的位点 62 处的半胱氨酸残基的氧化修饰是敏感的，所述位点对于 DNA-结合活性是至关重要的。这些至关重要的半胱氨酸残基的氧化经常通过氧化应激抑制转录因子活性。已经揭示，NF- κ B-结合位点是在 GM-CSF、TNF- β 1、IL-6 和与炎症有关的生长因子的启动子区的，而 TGF- β 1（最主要的纤维生成细胞因子）和 PDGF 的基因活化，通过结合存在于它的长末端重复序列上的 AP-1 位点而发生。在暴露于 MDA 和 HNE 时，NF- κ B 结合的活化暗示着应激信号传导途径会涉及氧化还原-敏感的因子 NF- κ B。STAP 在 STAP 载体转导的 HSC 中的超表达

会导致 NF- κ B 结合的降低,从而表明 STAP 能通过 NF-KB 途径抑制 HSC 的活化。STAP 对自由基-衍生的有机过氧化物的清除可以是适应性反应,以使细胞活化过程中的细胞氧化还原状态正常化。

总之,证实了 STAP 的转导能降低或抑制 TGF- β 1 和 α -SMA 的水平,从而预防 CCl₄ 诱导的大鼠肝硬化。单剂 rAAV 的稳定的基因转导可以预防肝硬化 (图 5c)。经 AP-1、NF- κ B、*c-myc* 和可能的其它多种清除肝硬化过程中的自由基-衍生的有机过氧化物的机理,通过 STAP 的超表达 (主要在 HSC 中),实现了免受细胞损伤的保护。组织学、免疫化学和生物化学的变化的模式,揭示了实验大鼠与在预防研究中所发现的类似的趋势。该研究建立了使用含有肝抗氧化基因的 rAAV 载体靶向 HSC 的新方案,并提供了开发患有进行性肝硬化的患者的基因治疗的潜力。

参考文献:

1. Aguilar-Delfin, I., Lopez-Barrera, F., and Hernandez-Munoz R. (1996) Selective enhancement of lipid peroxidation in plasma membrane in two experimental models of liver regeneration: partial hepatectomy and acute CCl₄ administration. *Hepatology* 24(3):657-662.
2. Asahina K., Kawada N., Kristensen D.B., Nakatani K., et al. (2002) Characterization of human stellate cell activation-associated protein and its expression in human liver. *Biochim. Biophys. Acta.* 1577(33):471-475.
3. Bahr, M.J., et al. (1999) Control of the tissue inhibitor of metalloproteinases-1 promoter in culture-activated rat hepatic stellate cells: regulation by activator protein-1 DNA binding protein. *Hepatology* 29:839-848.
4. Beljaar, L. et al., Successful targeting to rat hepatic stellate cells using albumin modified with cyclic peptides that recognize the collagen type VI receptor *J.Biol.Chem* 275, 12743-12751 (2000).
5. Di Sario, A. et al. Characterization of ion transport mechanisms regulating intracellular PH in hepatic stellate cells. *AM J Physiol.* 273, G39-48 (1997).
6. During, M.J., Xu, R.A., Young, D., Kaplitt, M.G., et al. (1998) Peroral gene therapy of lactose intolerance using an adeno-associated virus vector. *Nat. Med.* 4:1131-1136.
7. Friedman, S.L. (1993) The cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanisms and treatment strategies. *N. Engl. J. Med.* 328(25):1828-35.

8. Friedman, S.L. et al., Isolated hepatic lipocytes and Kupffer cells from normal human liver: morphological and functional characteristics in primary culture. *Hepatology* 15, 234-43 (1992).
9. Friedman, S.L., The cellular basis of hepatic fibrosis: Mechanisms and treatment strategies N Engl J Med. 328 (25), 1828-35 (1993).
10. Friedman, S.L., Liver fibrosis-from bench to bedside *J Hepatology* 38, S38-S53 (2003).
11. Gao, G.P. et al., Novel adeno-associated virus from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy, PNAS, 99, 11854-11859 (2002).
12. Gao, G.P., et al. (2002) Novel adeno-associated virus from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:11854-11859 (2002).
13. Iredale, J.P. New research provides a basis for rational and targeted treatment *BMJ* 327, 143-7 (2003).
14. Kawada, N., Krisensen, D.B., Asahina, K., Nakatani, K., et al. (2001) Characterization of a stellate cell activation-associated protein (STAP) with peroxidase activity found in rat hepatic stellate cells. *J. Biol. Chem.* 276:25318-25323.
15. Kim, SJ et al., Activation of the second promoter of the transforming growth factor- β 1 and phorbol ester occurs through the same target sequences, *J. Biol. Chem.* 264, 19373-19378, (1989).

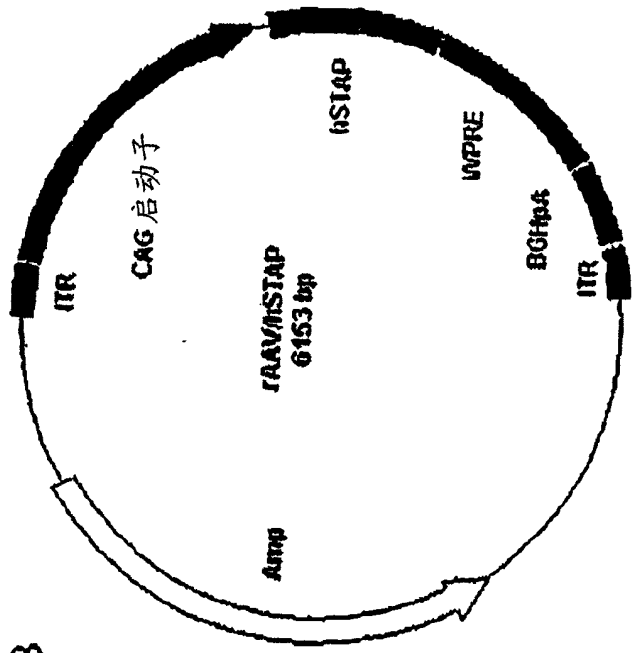
16. Lee K.S. et al. (1995) Activation of hepatic stellate cells by TGF α and collagen type I is mediated by oxidative stress through c-myc expression, *J. Clin. Inv.* 96:2461-2468.
17. Lee, M.Y., Hepatitis B virus infection *N. Engl. J. Med.* 24, 1733-1745 (1997).
18. Libermann, T.A. & Baltimore, D., Activation of the interleukin-6 gene expression through the NF-kappa B transcription factor, *Mol. cell Biol.* 10, 2327-2334, (1990).
19. Mari M. and Cederbaum, A.I. (2000) Cyp2E1 overexpression in HepG2 cells induces glutathione synthesis by transcriptional activation of γ -glutamylcysteine synthetase. *J. Biol. Chem.* 275:15563-15571.
20. Mendelson K.G. et al. (1996) Independent regulation of JNK/p38 intogen-activated protein kinases by metabolic oxidative stress in the liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:12908-12913.
21. Messer, G., Weiss, E.H. & Baeuerle, P.A. Tumor necrosis factor beta (TNF-beta) induces binding of the NF-kappa B element in the TNF-beta promoter, *Cytokine*, 2, 1-9, (1990).
22. Miao, C.H. et al., Nonrandom transduction of recombinant adeno-associated virus vectors in mouse hepatocytes in vivo: cell cycling does not influence hepatocyte transduction, *J. Virol.* 74, 3793-3803 (2000).
23. Mitomo, K., Nakayama, K, Fujimoto, K, Sun .X, Seki, S & Yamamoto, K. Two different cellular redox systems regulate the DNA-binding activity of the

p50 subunit of NF-kappa B in vitro, *Gene*, 145, 197-203, (1994).

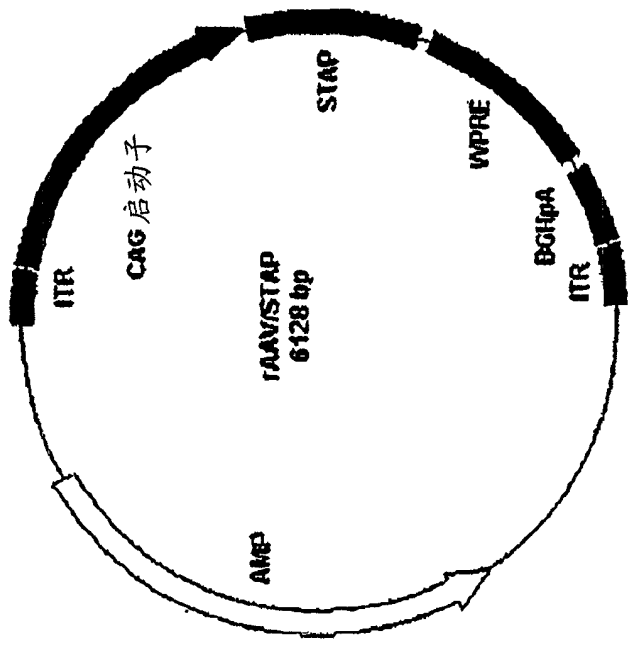
24. Nieto et al. (2001) Rat hepatic stellate cells contribute to the acute-phase response with increased expression of $\alpha 1(I)$ and $\alpha 1(IV)$ collagens, tissue inhibitor of metalloproteinase-1, and matrix-metalloproteinase-2 messenger RNAs. *Hepatology* 33(3):597-607.
25. Parola et al. (1998) HNE interacts directly with JNK isoforms in human hepatic stellate cells. *J. Clin. Invest.* 102:1942-1950.
26. Poli, G. and Parola, M. (1997) Oxidative damage and fibrogenesis. *Free Radical Biol. Med.* 22:287-305.
27. Rudolph, K.L., et al., (2000) Inhibition of experimental liver b cirrhosis in mice by telomerase gene therapy. *Science* 287:1253-1258.
28. Salgado, et al. (2000) Liver cirrhosis is reversed by urokinase-type plasminogen activator gene therapy. *Mol. Ther.* 2:545-551.
29. Salgado, S. et al., Liver cirrhosis is reversed by urokinase-type plasminogen activator gene therapy, *Mol. Ther.* 2, 545-551 (2000).
30. Schoonbroodt, S. & Piette, J., Oxidative stress interference with the nuclear factor-kB activation pathways, *Biochem. Pharmacol.* 60, 1075-1083 (2000).
31. Schreck, R. & Baeuerle, P.A., NF-kappa B as inducible transcriptional activator of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene *Mol Cell Biol* 10, 1281-1286 (1990).

-
32. Svegliati-Baroni, G., et al. (1999) *Hepatology* 29:1743-1751.
33. Toledano, MB & Leonard. WJ, Modulation of transcription factor NF-kappa B binding activity by oxidation-reduction *in vitro PNAS*, 88, 4328-4332 (1991)
34. Uchida, K., Shiraishi, M., Naito, Y., Torii, Y., Nakamura, Y & Osawa, T., Activation of stress signaling pathways by the end product of lipid peroxidation, *J. Biol. Chem.* 274, 2234-2242, (1999).
35. Ueki, T. et al., Hepatocyte growth factor gene therapy of liver cirrhosis in rats *Nature Med.*, 5, 226-230 (1999).
36. Whalen R. et al. (1999) Activation of rat hepatic stellate cells leads to loss of glutathione S-transferase and their enzymatic activity against products of oxidative stress. *Hepatology*. 30:927-933.
37. Xu, L., Daly, T., Gao, C., Flotte, T.R., et al. (2001) CMV- β -actin promoter directs higher expression from an adeno-associated viral vector in the liver than the cytomegalovirus or elongation factor 1 α promoter and results in therapeutic levels of human factor X in mice. *Human Gene Ther.* 12:563-573.
38. Xu, R.A. et al., Long-term expression of angiostatin suppresses liver metastatic cancer in mice. *Hepatology* 37, 1451-1460 (2003)
39. Xu, R.A. et al., Quantitative comparison of expression with adeno-associated virus (AAV-2) brain-specific gene cassettes, *Gene Therapy*, 8, 1323-1332 (2001).

-
40. Xu, R.A., Cai, K.X., Zheng, D.X., Ma, H. & Fan, S.T. Molecular therapeutics of HBV, *Cur. Gene Ther.* 3, 341-356 (2003)
41. Yu, Q., Gue, L.G. & Rockey, D.C. Adenovirus-mediated gene transfer to nonparenchymal in normal and injured liver, *Am J. Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282(3) G565-72 (2002).
42. Zhao, T. et al., The role of human glutathione S-Ttransferases hGSTA1-1 and hGSTA2-2 in protection against oxidative stress, *Arch Biochem Biophys*, 367, 216-224 (1999).



1B



1A

图 1A-1B

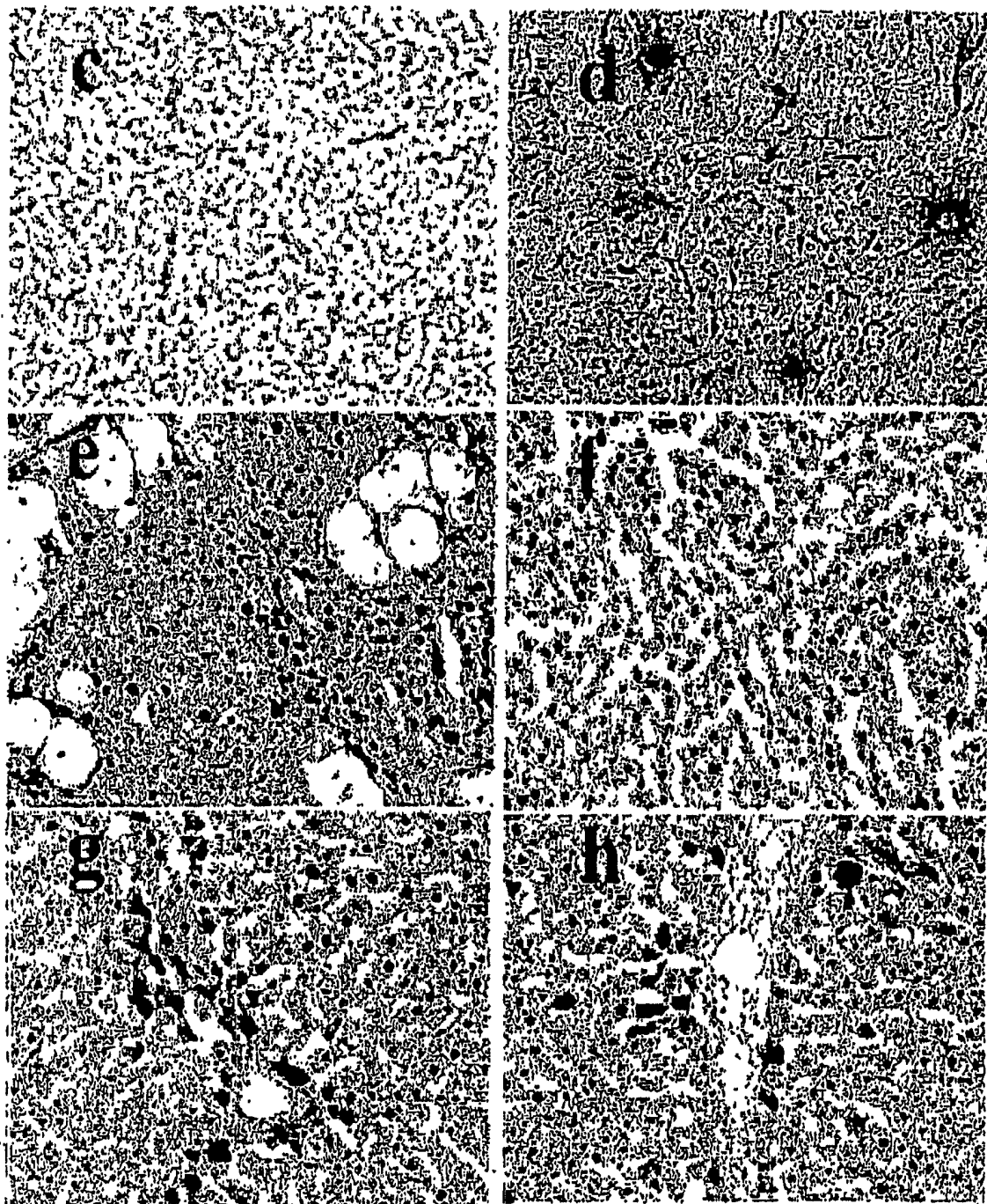


图 1C-1H

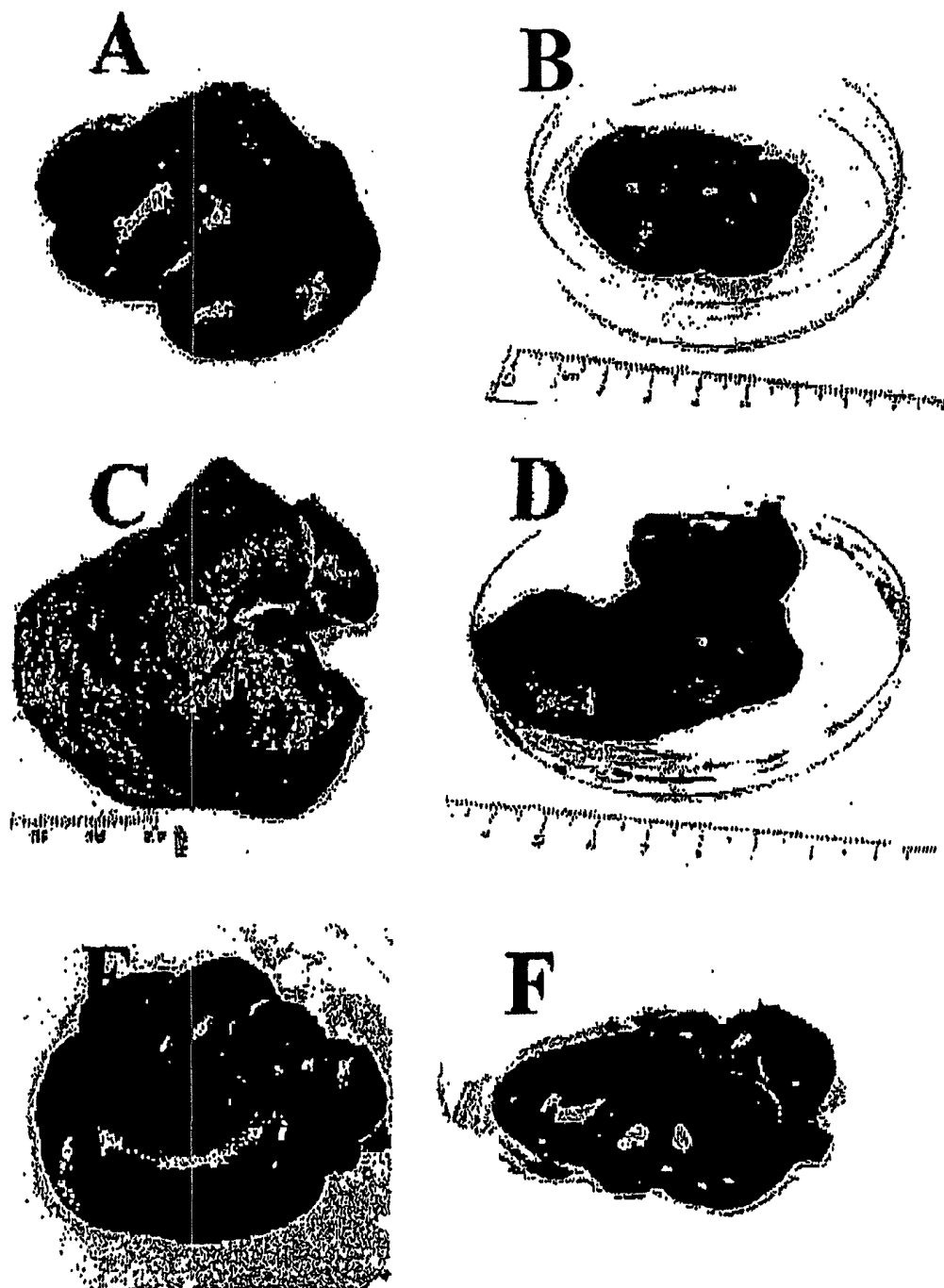


图 2A-2F

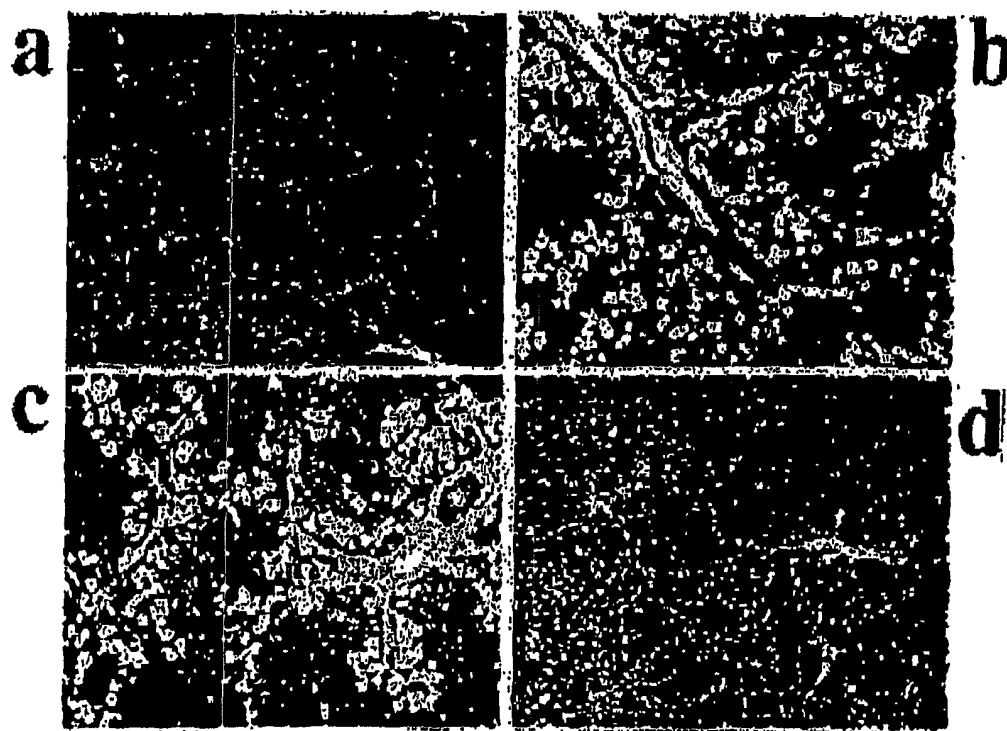


图 3A-3D

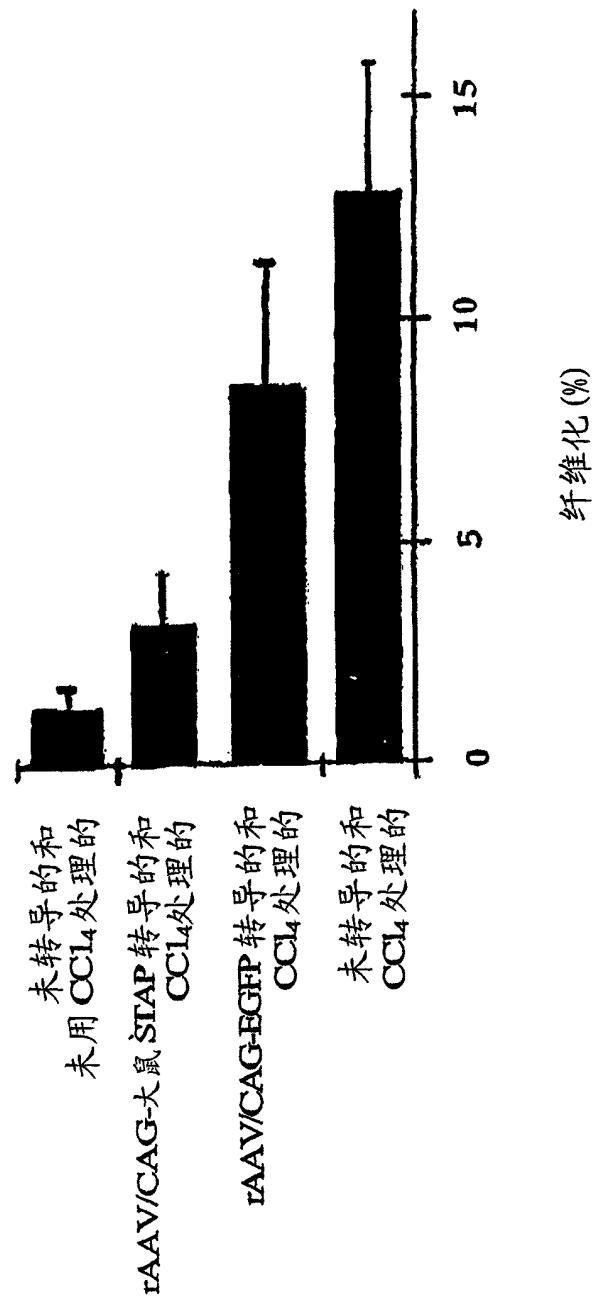


图 3E

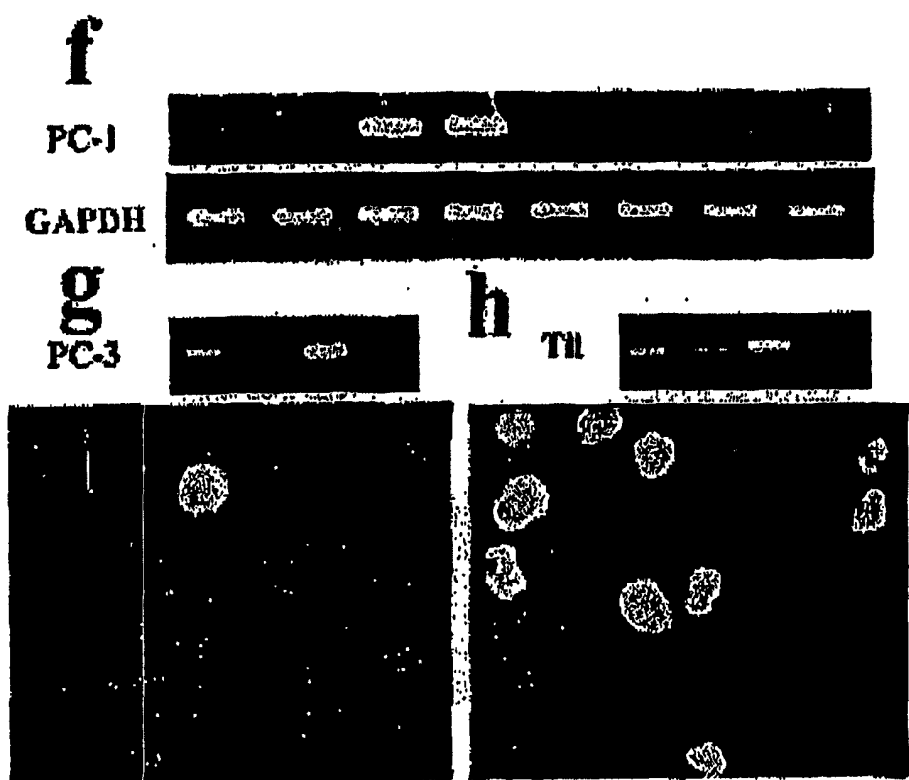


图 3F-3J

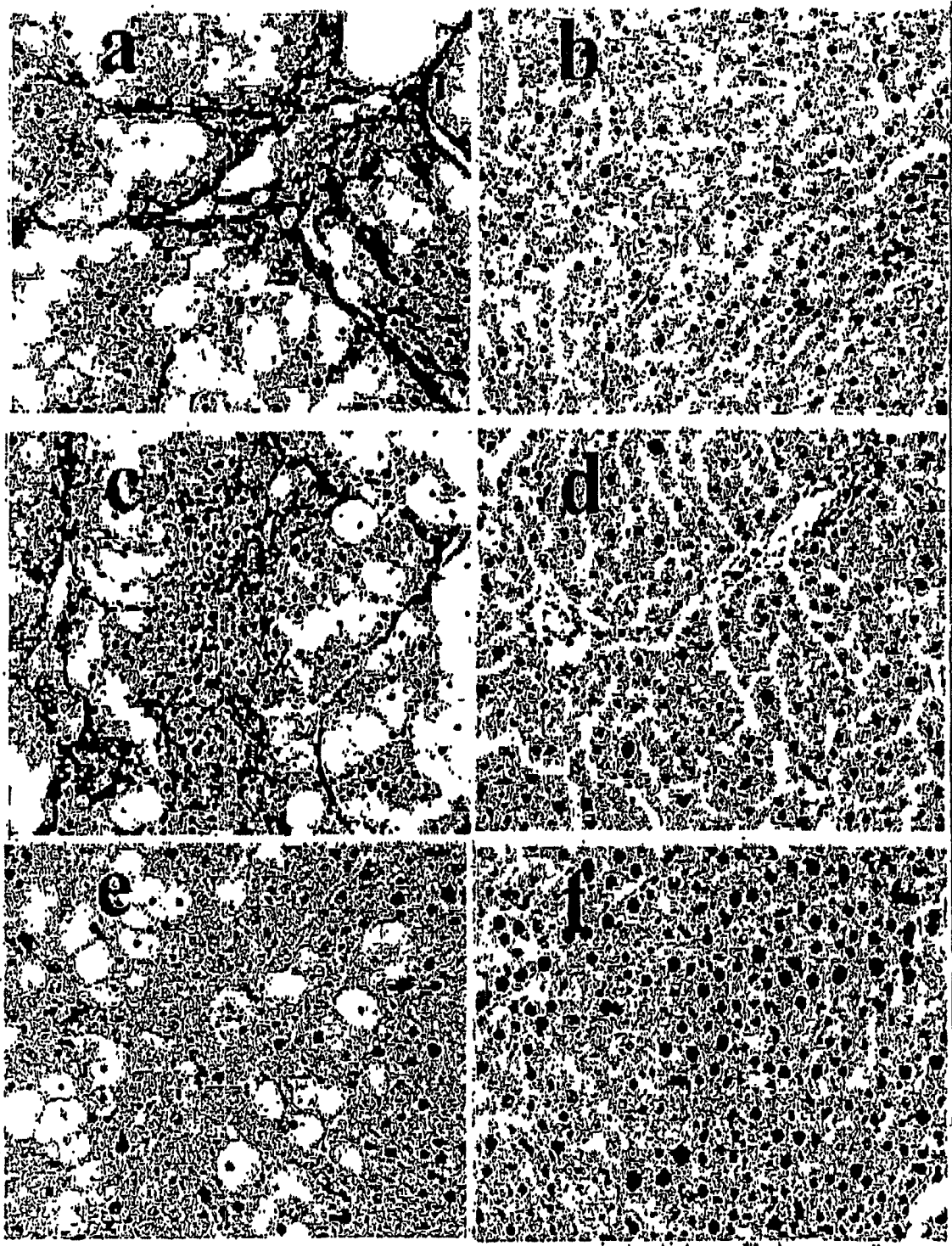


图 4A-4F



图 4G-4H

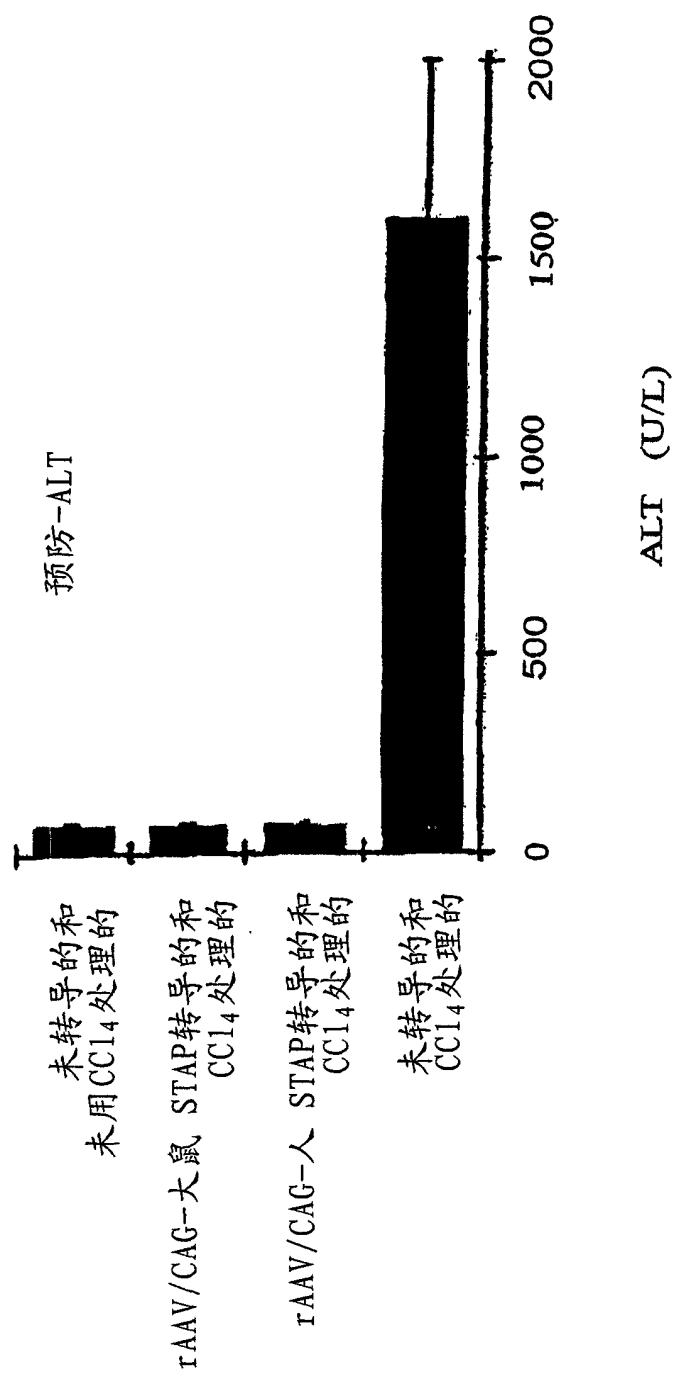


图 5A

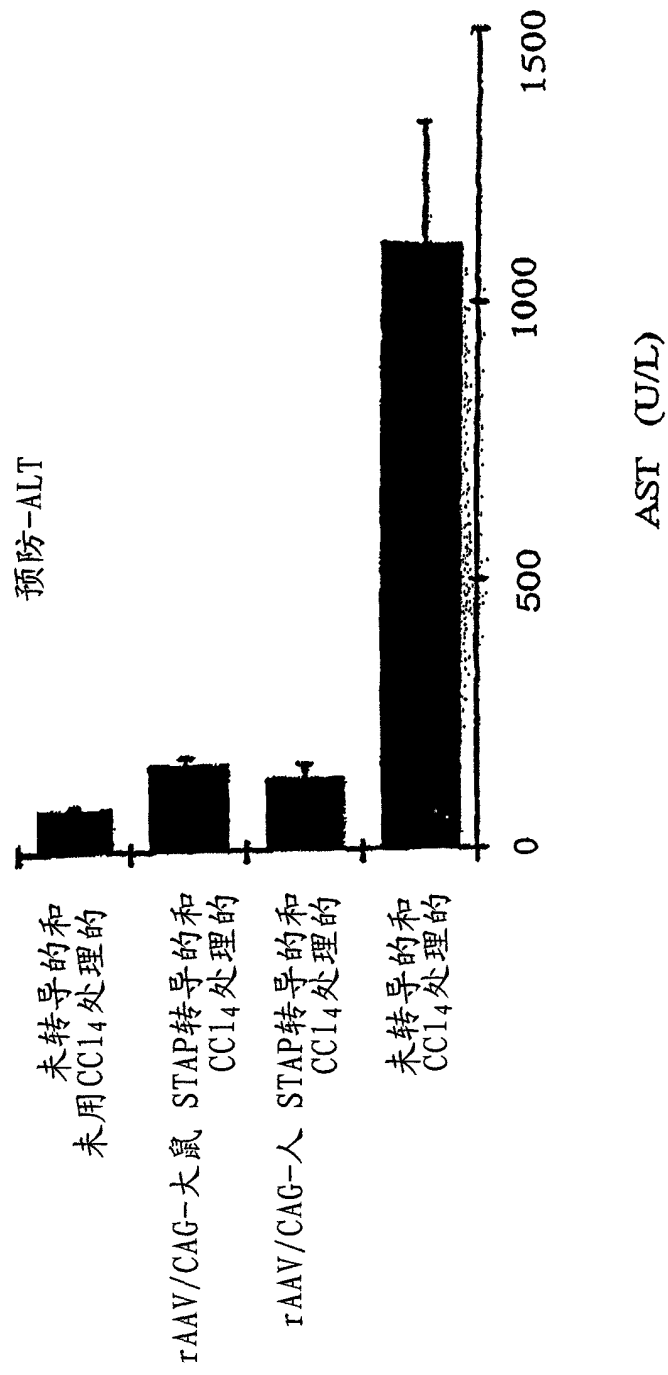


图 5B

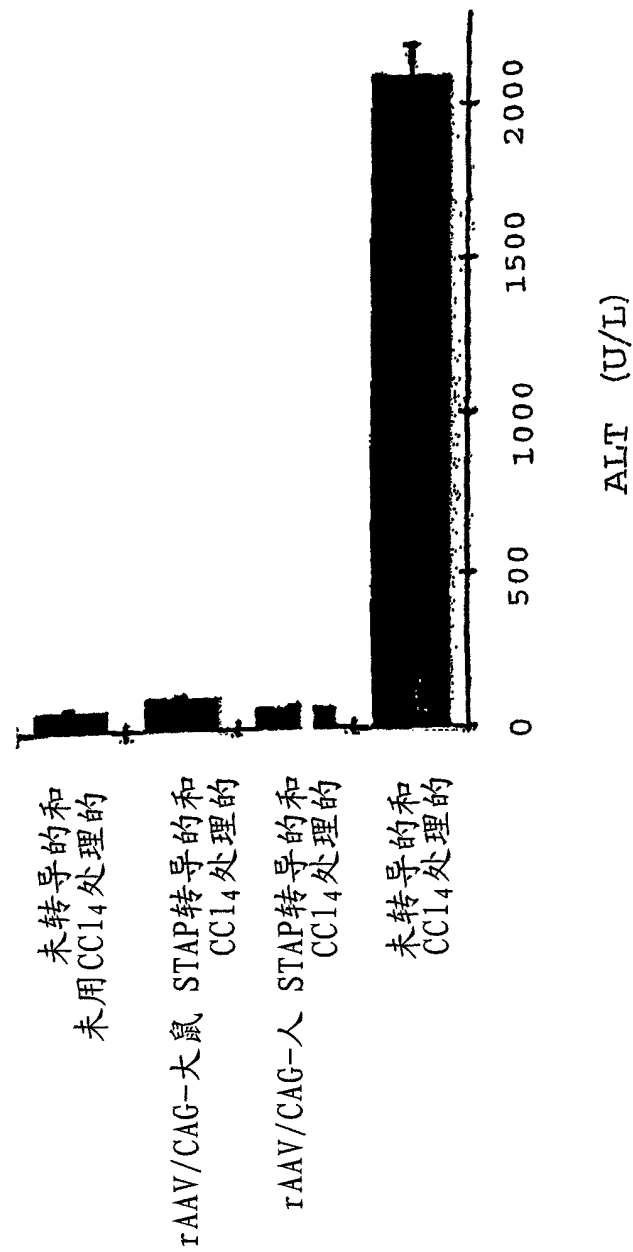


图 5C

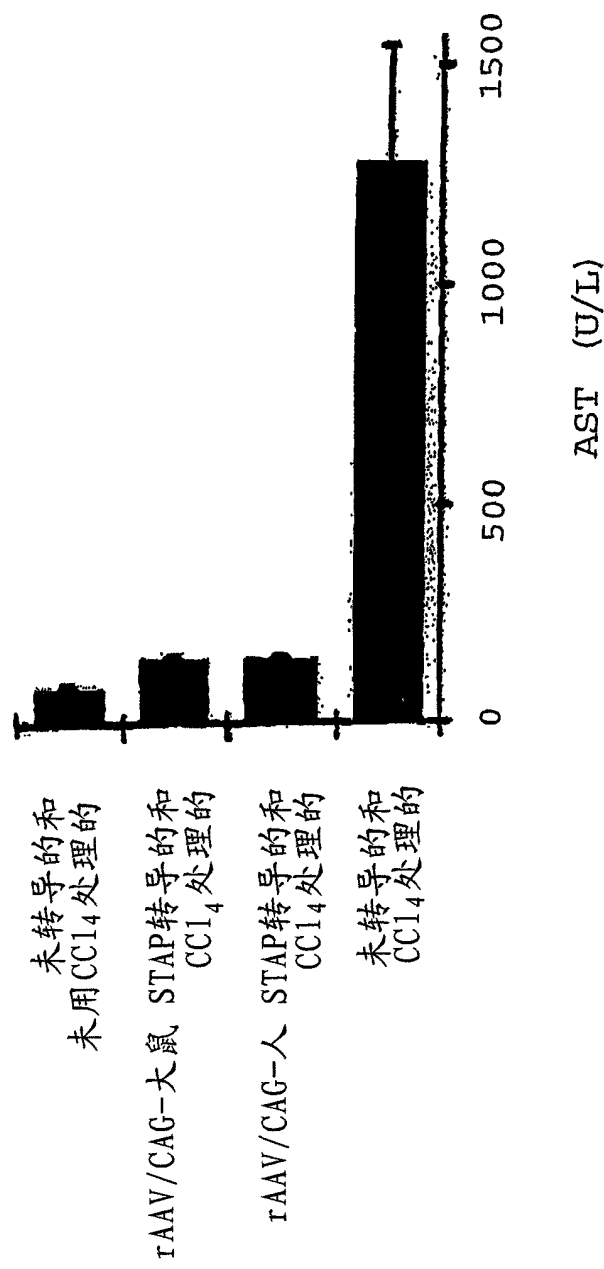


图 5D

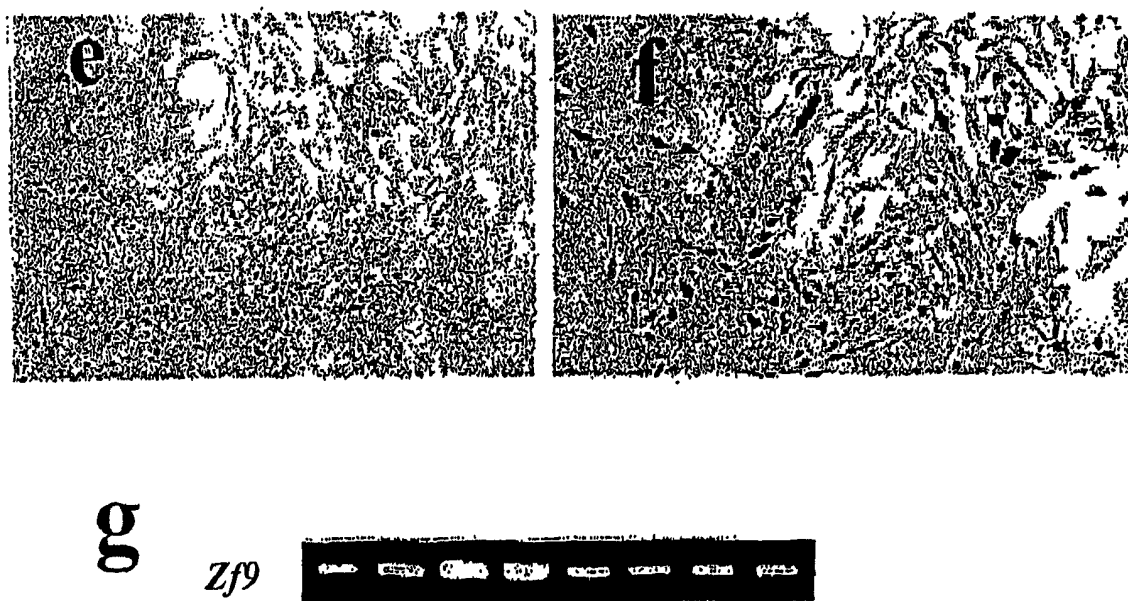


图 5E-5G

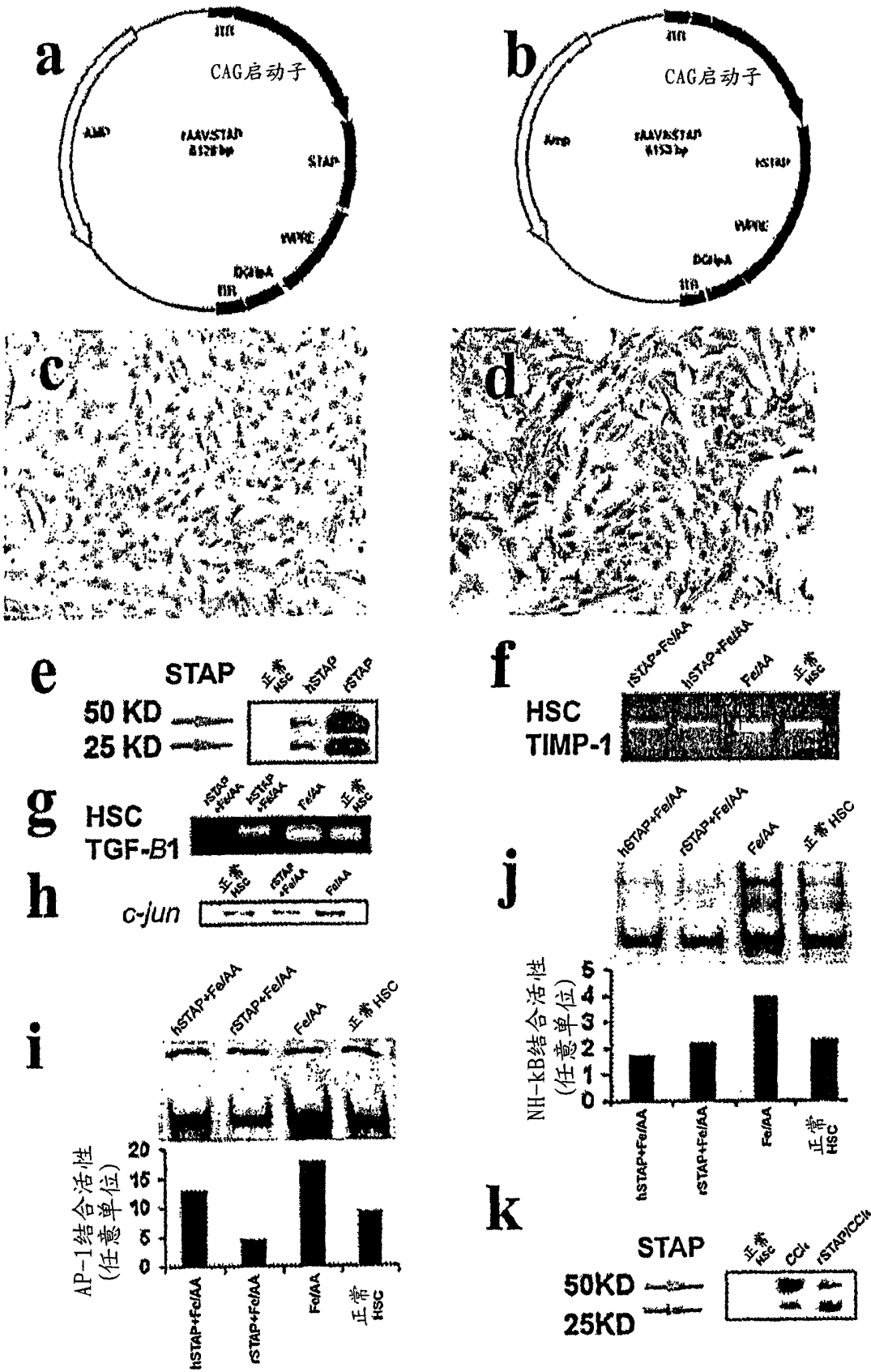


图 6A-6K

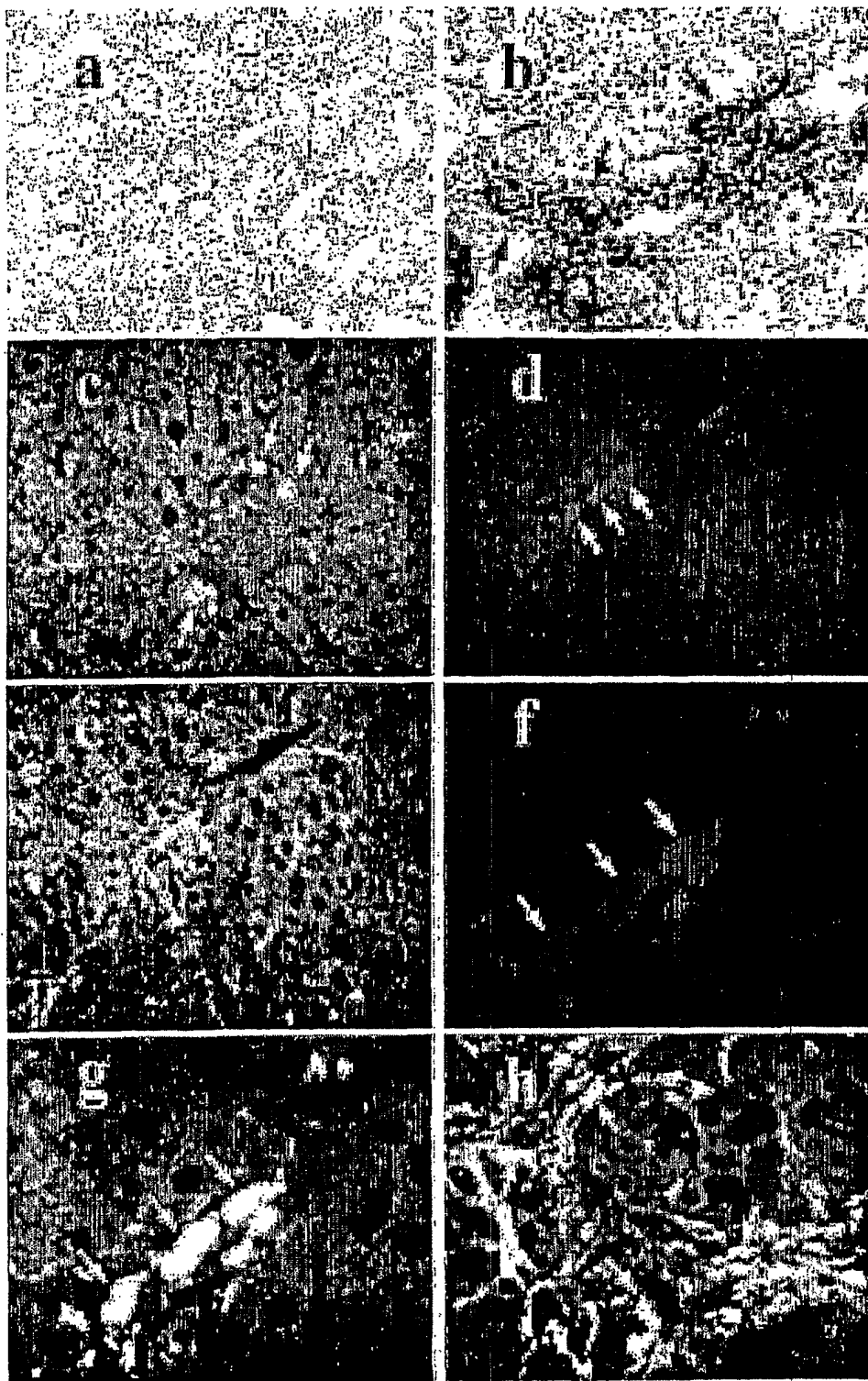


图 7a-h

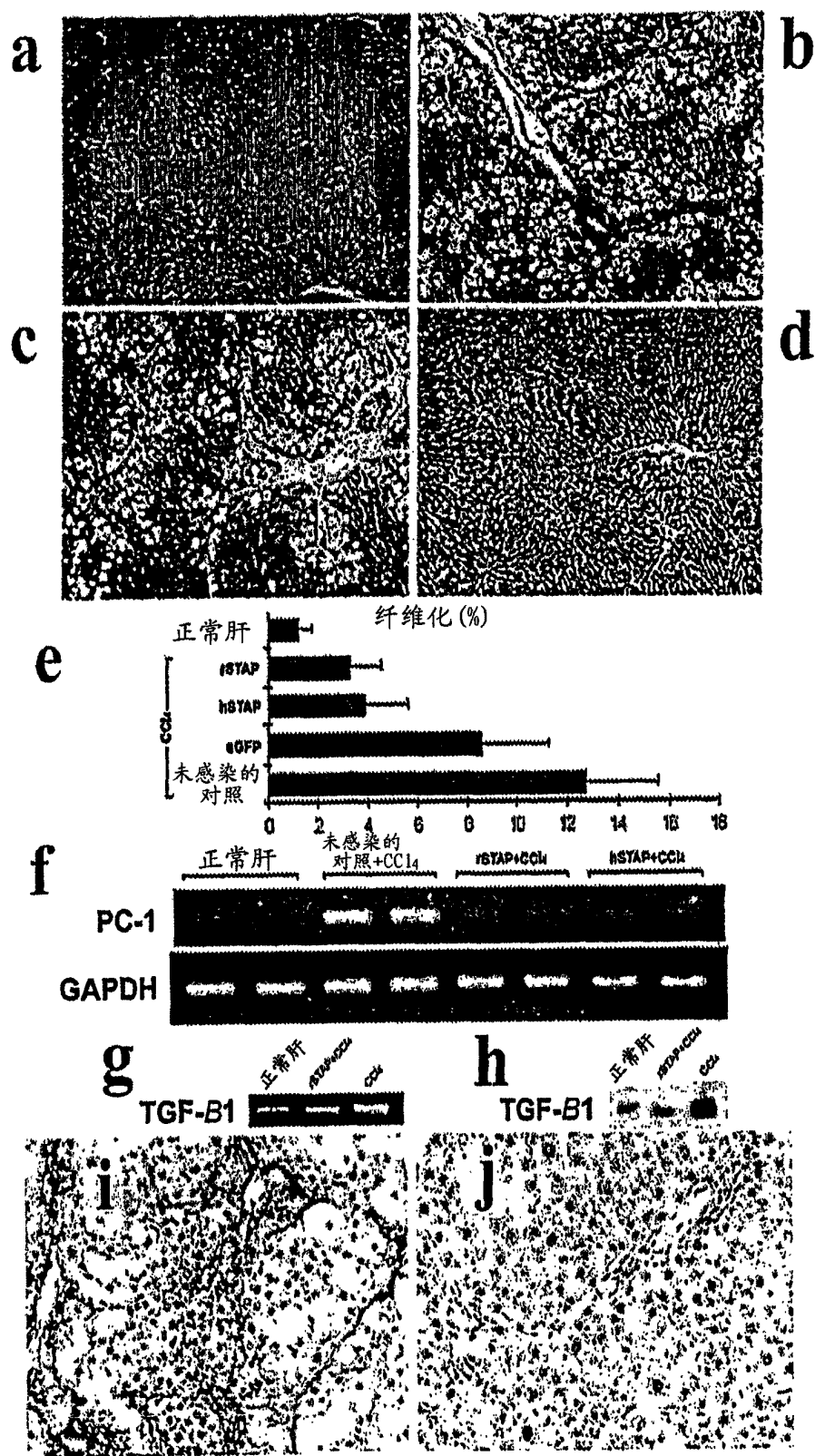


图 8A-8J

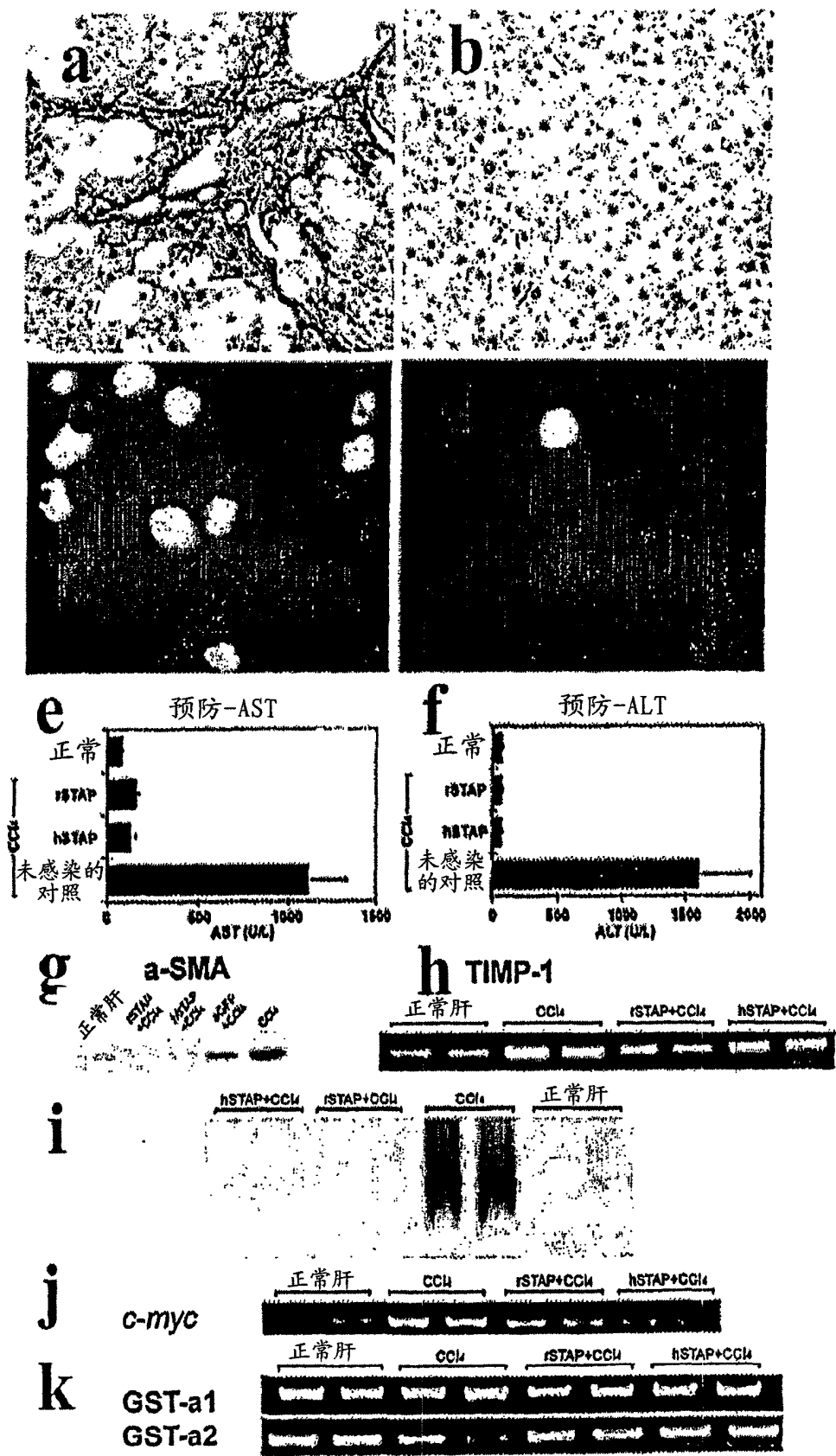


图 9A-9K

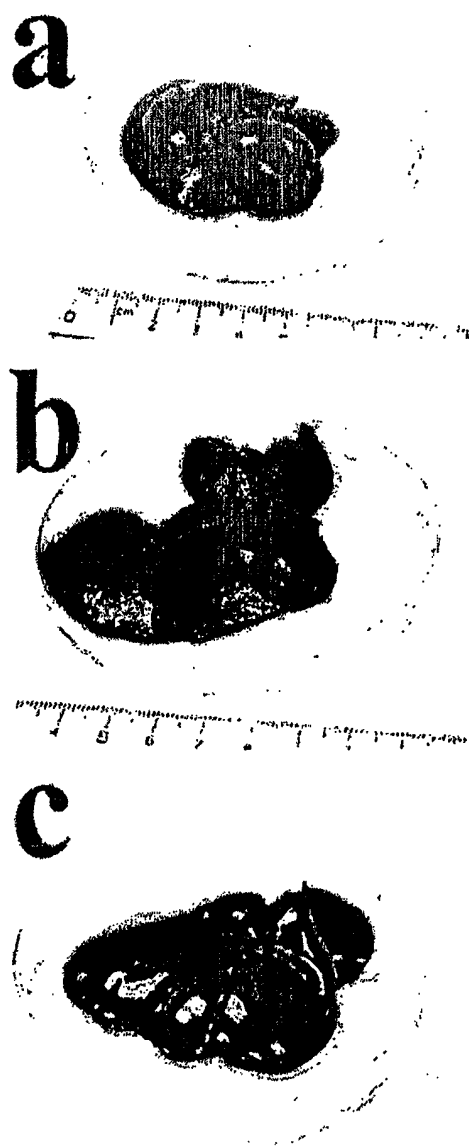


图 10A-10C

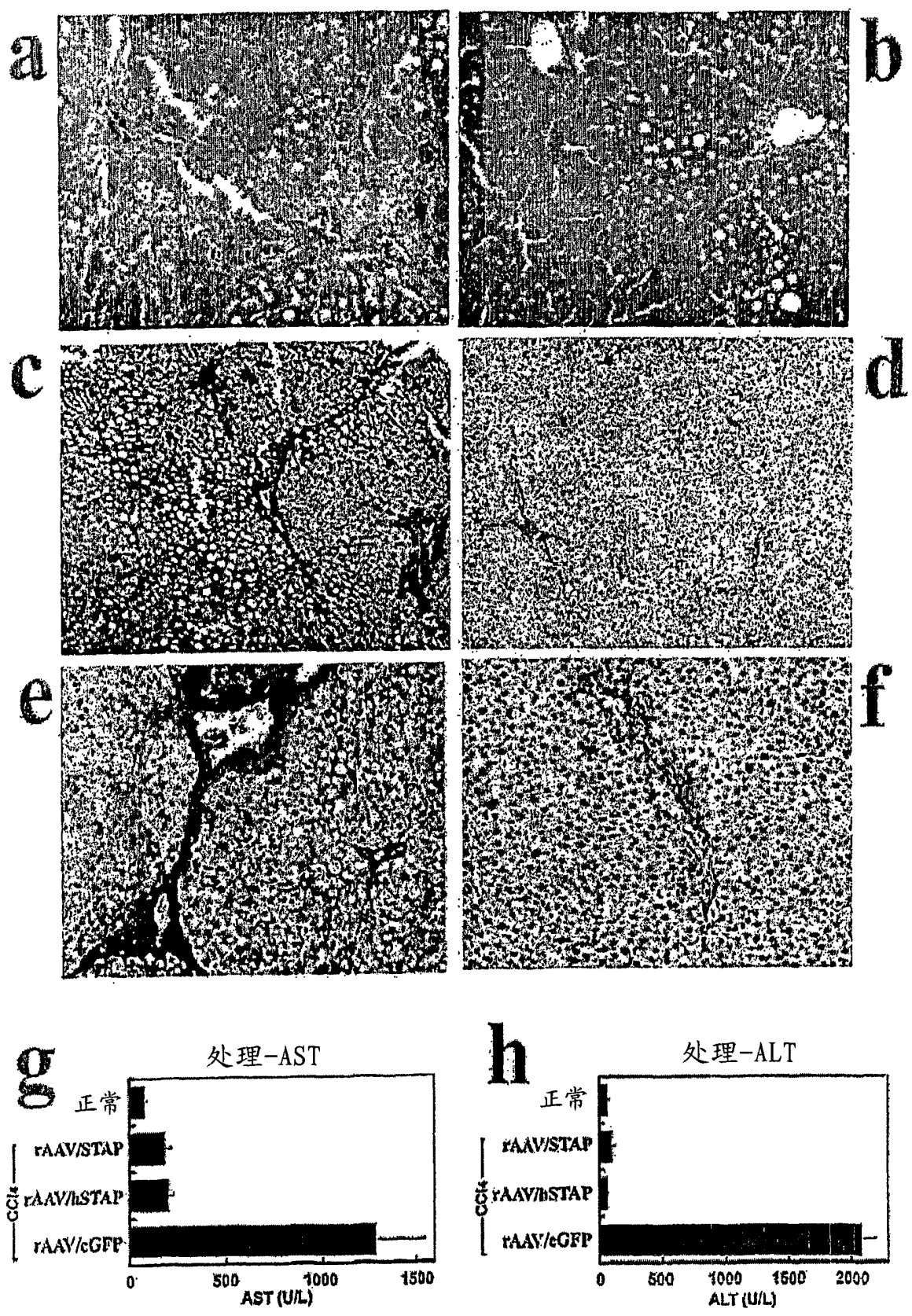


图 11A-11H

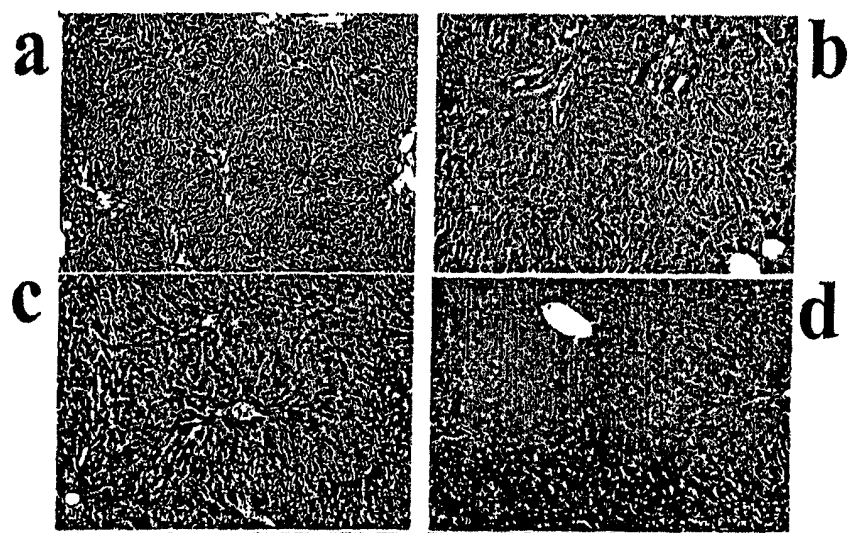


图 12A-12D

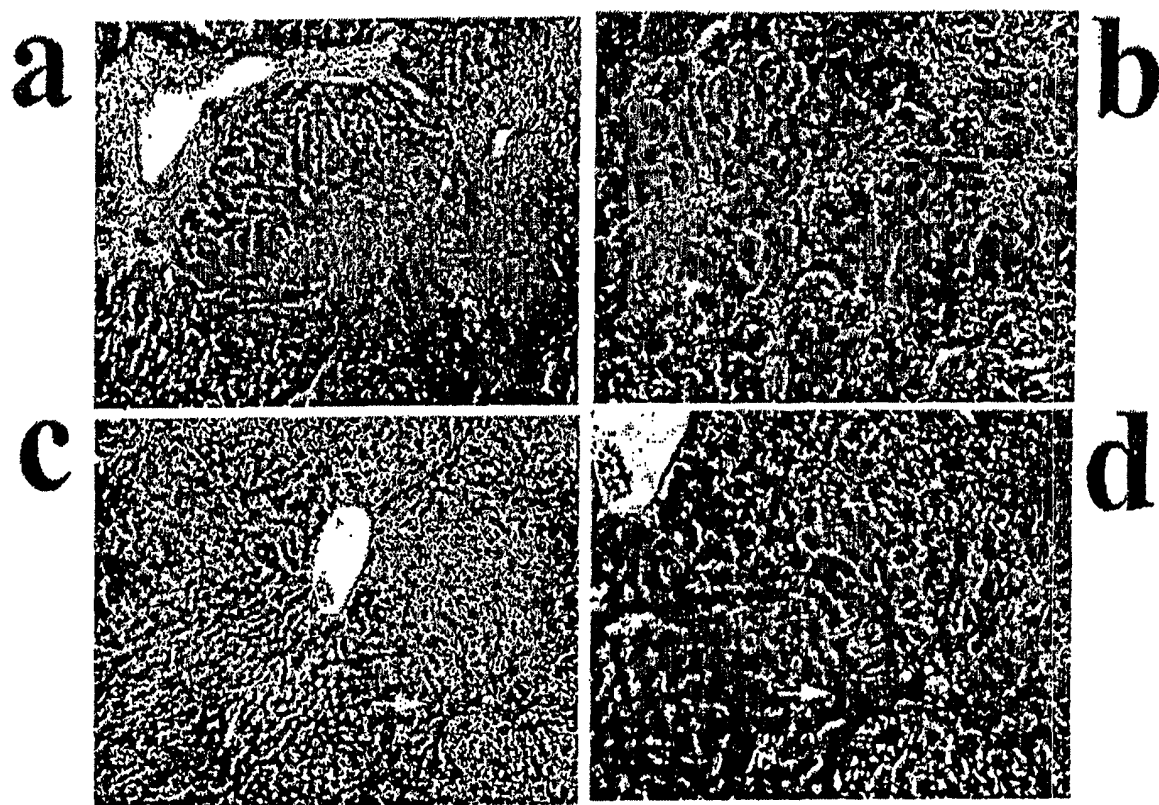


图 13A-13D

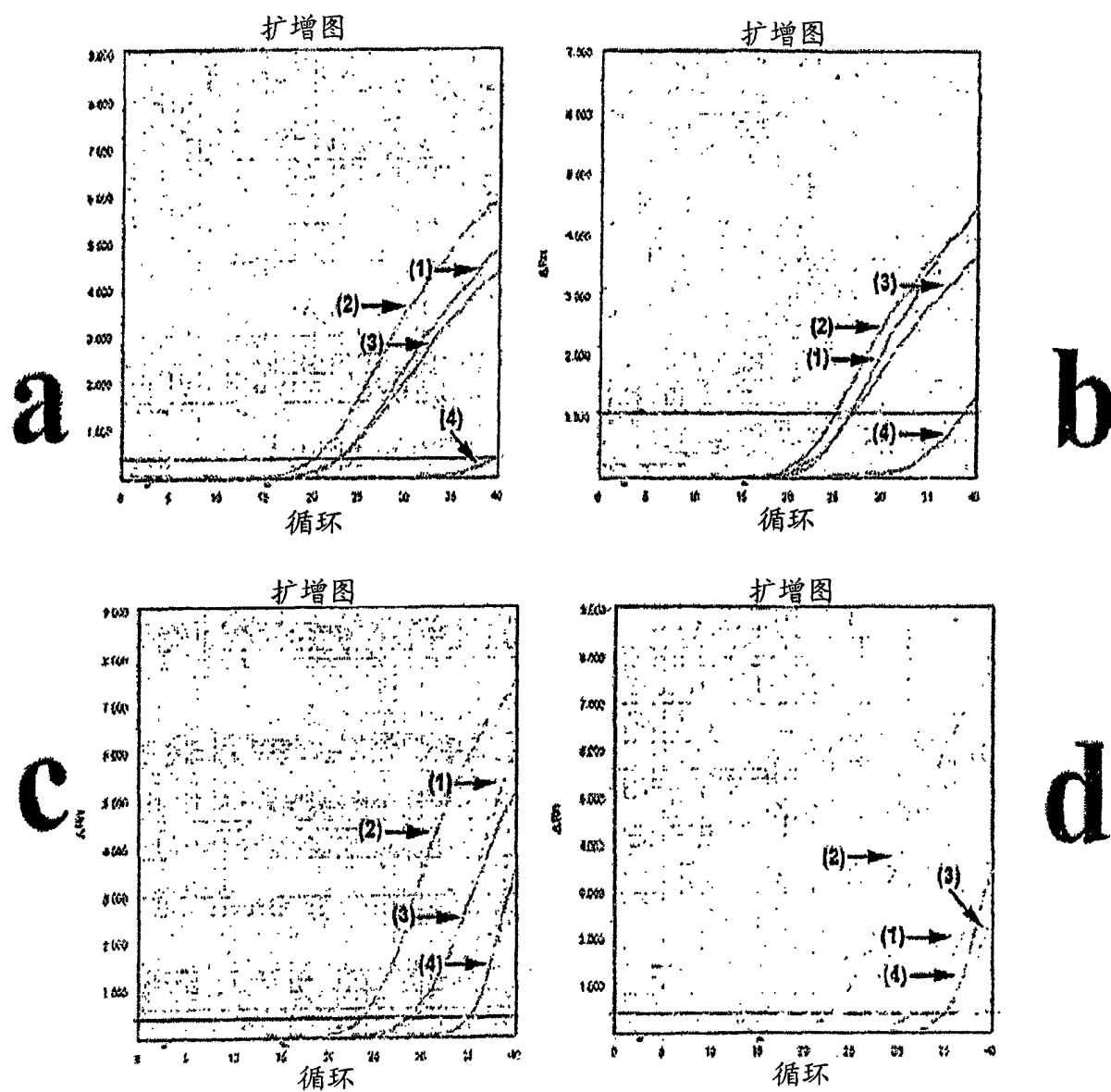


图 14A-14D

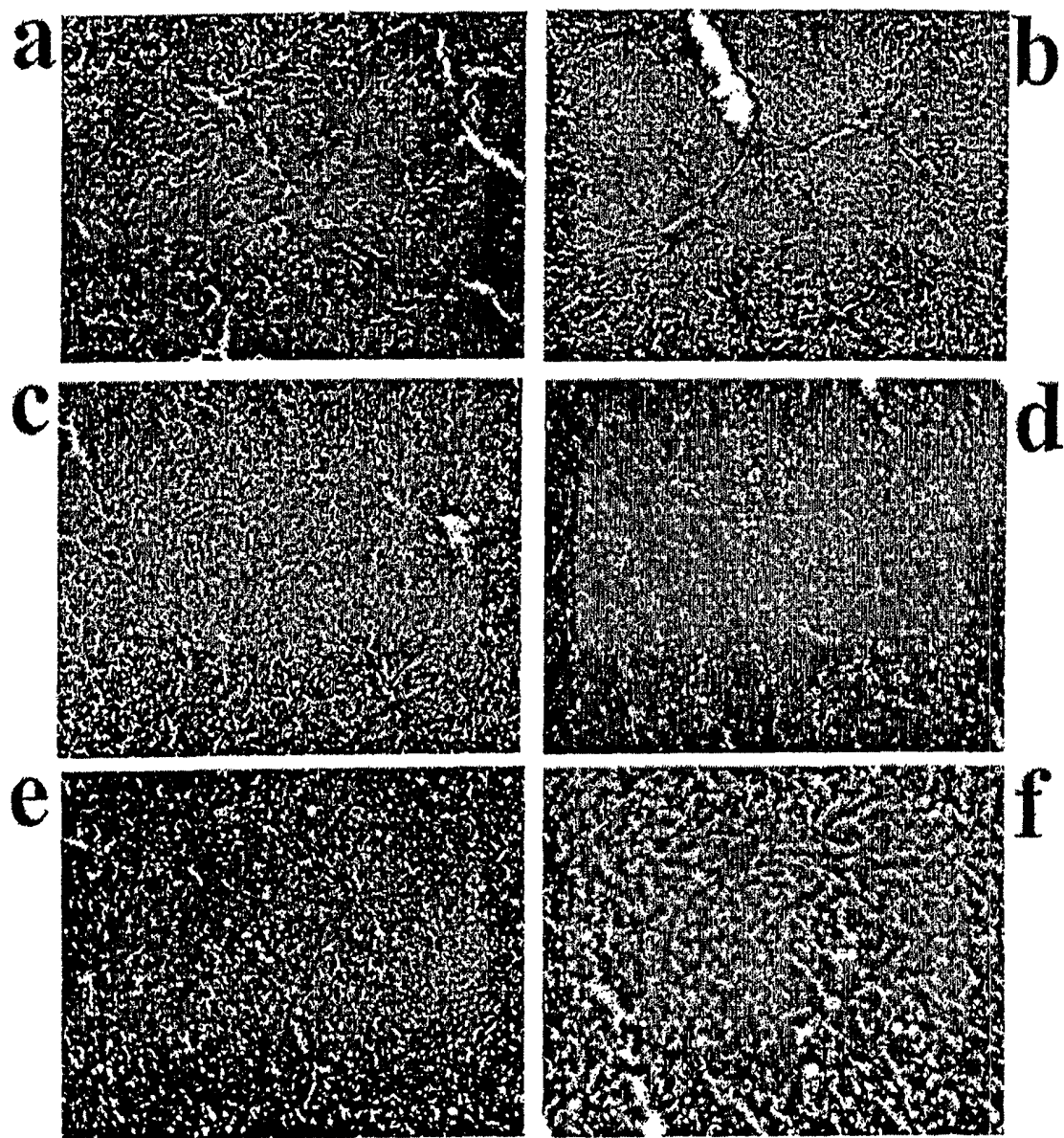


图 15-15F